

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Liisbeth Kose

***Pectobacterium wasabiae* tüve SCC3193 *fis* negatiivse mutandi
konstrueerimine ja iseloomustamine**

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Andres Mäe

TARTU 2014

SISUKORD

| | |
|--|----|
| LÜHENDID | 4 |
| SISSEJUHATUS | 5 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 6 |
| 1.1. <i>Pectobacterium wasabiae</i> | 6 |
| 1.2.1 Pektinaasid..... | 8 |
| 1.2.2 Tsellulaasid..... | 9 |
| 1.2.3 Proteaasid | 10 |
| 1.2.4 Nip | 11 |
| 1.3 Virulentsusfaktorite regulatsioon | 12 |
| 1.3.1 Hulgatunnetus ehk quorum sensing..... | 12 |
| 1.3.2 Kahekomponentsed süsteemid | 13 |
| 1.3.3 KdgR..... | 14 |
| 1.3.4 FlhDC | 14 |
| 1.4 Csr/Rsm süsteem bakterites..... | 15 |
| 1.4.1 Rsm süsteem <i>Pectobacterium wasabiae</i> | 15 |
| 1.5 Fis valk | 16 |
| 1.5.1 Fis-i seondumine DNA-ga..... | 16 |
| 1.5.2 Fis transkriptsiooniregulaatorina | 17 |
| 2. EKSPERIMENTAALNE OSA | 20 |
| 2.1. Töö eesmärgid | 20 |
| 2.2 Materjal ja meetodika..... | 21 |
| 2.2.1 Tüved ja plasmiidid | 21 |
| 2.2.2. Söötmed ja kasvatamine | 22 |
| 2.2.3. PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon | 22 |
| 2.2.4 DNA geelelektroforees | 23 |
| 2.2.5 Kloneerimine | 23 |
| 2.2.6 Sekveneerimine | 23 |
| 2.2.7 Transformatsioon, elektroporatsioon..... | 24 |
| 2.2.8 Ekstratsellulaarsete enüümide aktiivsuse määramine | 24 |
| 2.2.9 <i>Fis</i> negatiivse mutandi konstrueerimine..... | 25 |
| 2.2.10 Liikuvuse testimine..... | 26 |
| 2.2.11 Virulentsuse testimine | 26 |
| 2.3 Tulemused ja arutelu | 27 |
| 2.3.1 Fis valk ei mõjuta bakteritüvede kasvu | 27 |

| | |
|--|----|
| 2.3.2 Fis valgu mõju virulentsusfaktorite sünteesile | 29 |
| 2.3.3 Fis valgu mõju liikuvusele..... | 33 |
| 2.3.4 Fis mõjutab P_w virulentsust kartulis | 34 |
| 2.3.5 Järeldused | 36 |
| KOKKUVÕTE | 37 |
| SUMMARY | 38 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 39 |
| LIHTLITSENTS..... | 46 |

LÜHENDID

Amp – ampitsilliin

bp – aluspaar (ingl. k *base pair*)

Cel – tsellulaas

CMC – karboksümetüülselluloos

Fis – globaalne regulaatorvalk (ingl. k *factor for inversion stimulation*)

FlhDC – viburi geenide ekspressiooni reguleeriv valkkompleks

HTH – heeliks-pööre-heeliks DNA seondumismotiiv (ingl. k *helix-turn-helix*)

KDG – 2-keto-3-deoksüglükonaat

Km – kanamütsiin

LB – Luria-Bertani sööde

Nip – nekroosi esilekutsuv valk (ingl. k *necrosis inducing protein*)

nt – nukleotiid

OD – optiline tihedus (ingl. k *optical density*)

PCWDE – taime rakuseina lagundavad ensüümid (ingl. k. *plant cell wall degrading enzymes*)

Pae – pektiinatsüülesteras

Peh – endopolügalakturonaas

Pel – pektaatlüaas

PGA – polügalakturoonhape

Pme – pektiinmetüülesteras

Pnl – pektiinlüaas

Prt – proteaas

Pw – Pectobacterium wasabiae

Rsm – sekundaarsete metaboliitide regulaator (ingl. k *regulator of secondary metabolites*)

sRNA – väike mittekodeeriv RNA molekul

SOB – Super Optimal Broth

TCS – kahekomponentne süsteem (ingl k. *two component system*)

SISSEJUHATUS

Pectobacterium wasabiae (*Pw*) on taimepatogeen, kes põhjustab märgmädanikku paljudel majanduslikku tähtsust omavatel kultuurtaimedel. Kuna *Pw* on laia peremeesringiga ning on võimeline nakatama selliseid taimi, nagu porgand, kaalikas, kurk ja kartul, põhjustab patogeen sellega suurt majanduslikku kahju. *Pw* virulentsusfaktoriteks on taime rakuseina lagundavad ensüümid, mille hulka kuuluvad pektinaasid, tsellulaasid ja proteaasid. Pektinaasid ja tsellulaasid lagundavad taime rakuseinas olevat pektiini ja tselluloosi; proteaaside funktsiooniks on taimsete valkude lagundamine, et suruda maha taime kaitsemehhanismid.

Virulentsufaktorite produktsioon on väga täpselt reguleeritud, mis peab tagama selle, et virulentusfaktoreid toodetakse õigel ajal ja õiges kohas. Virulentsusfaktorite täpne ja koordineeritud regulatsioon on vajalik selleks, et ühest küljest suruda maha taime kaitsemehhanismid ning teisalt, et varustada järjest suurenevat bakteripopulatsiooni vajalike toitainetega. *Pw* virulentsusfaktorite täpne regulatsioon on saavutatud tänu mitmele globaalsele regulaatsioonisüsteemile, mis koos moodustavad regulatoorse võrgustiku, mis koordineerib virulentsusfaktorite sünteesi kogu infektsiooni protsessi vältel. Praeguseks kogunenud andmete põhjal võib väita, et selles keerulises võrgustikus on veel mitmeid komponente, mille funktsioon ei ole veel lõplikult selge.

Üheks oluliseks globaalseks regulaatoriks paljudes nii patogeensetes kui ka mittepatogeensetes bakterites on Fis valk, mis reguleerib mitmeid rakus toimuvaid füsioloogilisi protsesse, sealhulgas näiteks tRNA, biofilmi ja virulentsusgeenide transkriptsiooni.

Käesoleva töö kirjanduse osas antakse ülevaade virulentsusfaktorite regulatsioonist *Pectobacterium*ites. Lisaks käsitletakse ka Fis valgu rolli regulaatorvalguna bakterites. Töö eksperimentaalses osas kirjeldan *fis* negatiivse mutandi konstrueerimist ja iseloomustan Fis valgu mõju virulentsusfaktorite sünteesile ja liikuvusele taimepatogeenis *Pectobacterium wasabiae*.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. *Pectobacterium wasabiae*

Perekond *Pectobacterium* (eelnevalt kandnud ka *Erwinia* nime) kuulub *Enterobacteriaceae* sugukonda. Perekonda *Erwinia* kirjeldati esmakordselt 1917. aastal, kuhu kaasati kõik *Enterobacteriaceae* sugukonda kuuluvad bakterid, kes nakatavad taimi ja põhjustavad märgmädanikku nakatunud taimedes. Antud jaotus põhjustas palju arusaamatusi, sest süstematiseermisel ei lähtunud sugulusest, vaid teatud kindlast omadusest – võimest nakatada taimi (Pérombelon, 1990). Järgnevalt pakkus L. Hauben 1998. aastal 16S rDNA tulemuste põhjal välja, et märgmädanikku põhjustav perekond *Erwinia* tuleks ümber nimetada perekonnaks *Pectobacterium*. Olgugi et antud nimetus võeti kasutusele juba aastate eest, ei ole uus nimi siiani väga laialdast kasutust leidnud ja osa uurimisrühmi kasutab endiselt nime *Erwinia* (Hauben jt, 1998).

Pectobacteriumi perekonda kuuluvad taimepatogeenid *Pectobacterium antrosepticum*, *Dickeya dadantii* (eelnevalt nimetatud *Erwinia chrysanthemi*) ja käesolevas töös uurimisobjektiks olnud *Pectobacterium wasabiae* (*Pw*). Kõik nimetatud patogeenid on laia peremeestaimede ringiga ja on võimelised nakatama taimi nii põldudel kui ka keldrites ning hoidlates. Eelpool mainitud kolmest *Pectobacteriumist* on kõige laiema peremeesringiga patogeen *Pw*, kelle peremeestaimede hulka kuuluvad kartul, kapsas, porgand, seller, kurk ja lisaks veel mitmed olulist majanduslikku tähtsust omavad juurviljad.

Pw tüvi SCC3193 (varasemalt *Erwinia carotovora* aml. *carotovorum* ja sellele järgnevalt ümbernimetatud *Pectobacterium carotovorum* aml. *carotovorum*) isoleeriti esmakordselt nakatunud kartulimugulast Soomes 1980.-ndate alguses (Pirhonen jt, 1988). Hilisemate genoomiuuringute alusel klassifitseeriti ta *Pectobacterium wasabiae*ks (Nyykri jt, 2012). *Pw* on gramnegatiivne mittesporuleeruv bakter, kes on laialt levinud aeroobses ja ka mõõdukalt anaeroobses keskkonnas (tegu on fakultatiivse anaeroobiga). Patogeen on levinud nii mõõdukas kui ka subtroopilises kliimavöötmes. *Pw* on peritrihhiaalsete viburitega liikuv bakter, kes peale taime tungimist levib primaarsest nakatumiskohast kiiresti üle kogu taime (Nyykri jt, 2012; Perombelon, 2002; Toth jt, 2003). *Pw* nakatab taime erinevaid osasid, tungides taimekoesse kas läbi loomulike avauste, näiteks õhulõhed, või vigastatud taimeosade kaudu. Infektsiooni esimeses etapis, nn. latentses faasis, mille vältel taime rakuseina lagundavaid ensüüme ei toodeta, lokaliseerub patogeen põhiliselt taime apoplastis. Patogeeni kasv primaarses nakatumiskohas toimub apoplastis olevate toitainete arvelt, millele lisaks lagundatakse vähesel määral ka taimeraku vahelamellides olevaid polüsahhariide, mis on

patogeenile täiendavaks süsiniku- ja energiaallikaks, võimaldades seeläbi taime tunginud patogeeni arvukuse kasvu (Perombelon, 2002; Toth jt, 2003). Kui patogeeni arvukus primaarses nakatumiskohas on tõusnud ja kui keskkonnatingimused on patogeenile soodsad, jõuab patogeen haiguse teise faasi - infektsiooni etappi (Nyykri jt, 2012).

Haiguse teises, nn infektsioonifaasis, käivitatakse massiline taime rakuseina lagundavate ensüümide (virulentsusfaktorite) süntees, mis kahjustavad taimerakku (lagundavad taime rakuseina erinevaid komponente), nõrgestades nii taime kaitsemehhanisme kui ka varustades patogeeni toitainetega, mis vabanevad ensüümide toimel lagunenenud rakkudest (Toth jt, 2003). Taimede nakatumist soodustavad lisaks virulentsusfaktoritele ka mitmed keskkonnategurid, nagu näiteks vaba vee (sealhulgas ka õhuniiskuse) olemasolu, madal hapnikusisaldus ning kasvutemperatuur, mille optimum jääb vahemikku 20-28 °C. Ümbritseva keskkonna kõrge niiskuse tase võimaldab bakteril kergemini taimekudedesse tungida, lisaks soodustab see ka anaeroobse keskkonna teket, mis pärsib nakatunud peremeestaime võimet patogeeniga võidelda, inhibeerides taime resistentsusmehhanisme. Lisaks on anaeroobsetes tingimustes pärsitud ligniini süntees ja ka nakatunud taimekoe suberisatsioon (taimekoe paranemine) (Pirhonen jt, 1993; Pérombelon ja Salmond, 1995; Toth jt, 2003).

Taime eduka nakatamise ja infektsiooni leviku *Pectobacterium*itele tagavad soodsad keskkonnatingimused, viburite olemasolu ja taime rakuseina lagundavad ensüümid, mis varustavad patogeeni kasvamiseks vajalike toitainetega ning suruvad maha taime kaitsemehhanisme.

1.2 *Pectobacterium wasabie* virulentsusfaktorid

Pw virulentsusfaktoriteks on rakuseina komponente lagundavad ekstratsellulaarsed ensüümid (PCWDE; ingl. k. *plant cell wall degrading enzymes*), mis lagundavad taime rakukesta erinevaid komponente. Kõige olulisema rühma PCWDE hulgas moodustavad pektiini lagundavad ensüümid ehk pektinaasid, mille hulka kuuluvad polügalakturonaas (Peh), pektaatlüaas (Pel) ja pektiinlüaas (Pnl) (Collmer ja Keen, 1986). Lisaks pektiini lagundavatele ensüümidele sünteesivad *Pectobacteriumi* tüved ka tselluloosi ja taime rakuseinas olevaid valke lagundavaid ensüüme (Marits jt, 1999). Peremeestaime edukaks nakatamiseks vajab patogeen kõikide PCWDE õigeaegset ja koordineeritud ekspressiooni. Kui ühe või mõne PCWDE geeni inaktiveerimine vähendab ainult osaliselt patogeeni virulentsust, siis täiesti avirulentse mutandi saamiseks on vajalik kõikide PCWDE geenide inaktiveerimine. Nii on näidatud, et *Pw* SCC3193 tsellulaas negatiivsel mutandil on virulentsus võrreldes *wt* tüvega ainult osaliselt vähenenud (Mäe jt, 1995), *expA* negatiivne mutant, mis ei sünteesi ühtegi PCWDE-d ei ole aga võimeline nakatama ühtegi peremeestaime (Hyytiäinen jt, 2003).

Ensüümide tootmine on reguleeritud mitmete erinevate regulatsioonisüsteemide vahendusel nii transkriptsiooni kui ka translatsiooni tasemel. Patogeeni edukus peremeestaime nakatamisel sõltub keskkonnast saadavatest signaalidest, mis on vajalikud, et bakter käivitaks virulentsusfaktorite sünteesi õigel ajas ning õiges kohas. Siin omavad tähtsat rolli kahekomponentsed süsteemid, mis reguleerivad virulentsusfaktorite sünteesi sõltuvalt keskkonnast tulevatele signaalidele (Hyytiäinen jt, 2003). Lisaks sellele sõltub virulentsusfaktorite süntees ka patogeeni arvukusest nakatunud taimekoos. Mitmed uurimisrühmad on näidanud, et *Pw* käivitab virulentsusfaktorite sünteesi alles siis, kui patogeeni arvukus primaarses nakatumiskohas on saavutanud arvukuse 10^6 rakku/ml ehk patogeen on jõudnud statsionaarsesse kasvufaasi (Saarilahti, 1990; Pirhonen jt, 1993; Flego jt, 2000; Pemberton jt, 2005).

1.2.1 Pektinaasid

Pektinolüütilised ensüümid (mõnikord lühendatult ka pektinaasid) on *Pectobacteriumi* tüvede üks olulisemaid märgmädanikke põhjustavad virulentsusfaktorid. Pektinaasid on ekstratsellulaarsed ensüümid, mis lagundavad taime rakuseinas olevat pektiini polümeeri, mis koosneb omavahel α -1,4 glükosiidsidemega seotud galakturoonhappe jääkidest, millest 60-80% võivad olla metüleeritud. Pekiini leidub nii rakkudevahelises ruumis kui ka taimeraku kesklamellis. Pekiini lagundamine põhjustab taimekudede pehmenemist, mis omakorda viib rakkude hukkumisele ja kahjustatud taimekoe matseratsioonini. Pektinaaside hulka kuuluvad pektaatlüaas (Pel), pektiinlüaas (Pnl), polügalakturonaas (Peh) ja pektiinmetüülesterasaas (Pme)

(Collmer ja Keen, 1986). Pektiinesteraasid (Pme/Pae) eemaldavad metüül/atsetüül rühmad pektiinist; pektiinlääs (Pnl) lagundavad pektiini ahelat, eemaldades sellest vee molekuli (β -eliminatsioon); polügalakturonaasid (Peh) lagundavad pektiini ahelat hüdrolyüsi käigus. Pektaatlääs (Pel-id) ei suuda efektiivselt lagundada täielikult metüleeritud pektiini, kuid neile on sobivaks substraadiks pektaat ja keskmiselt metüleeritud pektiin (lagundavad substraati β -eliminatsiooni teel) (Abbott ja Boraston, 2008). Pektiini hüdrolyüsil vabanevaid oligogalakturniide on bakterid võimelised kasutama süsiniku- ja energiaallikana. Pektinaasid transporditakse rakust välja tüüp II sekretsioonisüsteemi - niinimetatud *Out*-süsteemi vahendusel (Lindeberg jt, 1998).

Kõige olulisemad pektiini lagundavatest ensüümidest on pektaatlääs (Pel). Pektaatlääs esinevad rakus enam kui ühes vormis, täpsemalt isoensüümidena (McMillan jt, 1994). Taimepatogeenidest isoleeritud erinevad pektaatlääsi isovormid on sageli erineva substraadi spetsiifikaga ja lisaks ekspresseeruvad nende sünteesi määravad geenid infektsiooni erinevates etappides. Lisaks sõltub osade pektaatlääside süntees ka ümbritsevatest keskkonnatingimustest (pH, ionide kontsentratsioon). Sellega on ilmselt seletatav ka asjaolu, miks ühe üksiku pektaatlääsi puudumine ei mõjuta oluliselt patogeeni virulentsust (Beaulieu jt, 1993; Kelemu ja Collmer, 1993; Hugouvieux-Cotte-Pattat jt., 1996).

Pw tüvi SCC3193 produtseerib nelja erinevat pektaatlääsi PelA, PelB, PelC ja PelD. Nendest täpsemalt on iseloomustatud PelB-d. Heikinheimo jt. (1995) näitasid, et *pelB* geeni inaktivatsiooni tagajärjel ei täheldatud patogeeni virulentsuse vähenemist, mis andis alust arvata, et PelB on vajalik ainult teatud kindla(te) peremeestaime nakatamisel (Heikinheimo jt, 1995).

1.2.2 Tsellulaasid

Tselluloos on biopolümeer, mis koosneb 7000-15000 glükoosi molekulist, mis on omavahel seotud β -1,4-glükosiidsidemega. Tselluloos on olulisim taimedes olev polümeer, mis annab taimerakkudele kuju ja tugevuse ning teda leidub nii primaarses kui ka sekundaarses rakuseinas (Crawford, 1981).

Olgugi et tsellulaase ei peeta virulentsuse seisukohalt esmatähtsateks, on nad siiski koos teiste eksoensüümidega vajalikud, et tagada maksimaalselt edukas ja kiire peremeestaime nakatamine (Mäe jt, 1995; Saarilahti jt, 1990; Walker jt, 1994). Märkmädanikku põhjustavate bakterite tsellulaaside rolli kohta on suhteliselt vähe teada, kuid sellegipoolest arvatakse, et vastavad ensüümid varustavad taime rakukesta lagundamise teel baktereid toitainetena

kasutatavate laguproduktidega ja soodustavad patogeenide läbitungivõimet (Mäe jt, 1995). *Pw*-s on kirjeldatud kahte erinevat tsellulaasi: CelV1 ja CelS (Saarilehti jt, 1990; Cooper ja Salmond, 1993), millest CelV1 on peamine *Pw* poolt toodetud tsellulaas (Mäe jt, 1995).

CelV-d mittekodeeriv mutant ei olnud võimeline produtseerima tsellulaasi ja selle tulemusena oli vähenenud vastava mutandi virulentsus tubakataimedel (Mäe jt. 1995; Walker jt 1994) Samas *celS* geeni inaktivatsioon ei mõjutanud rakkude tsellulaasset aktiivsust ega ka haigussümptomite teket taimedel (Mäe jt, 1995). See andis aluse arvamuseks, et CelV1 on oluline just taime rakuseinas olevate tselluloosi molekulide lagundamisel, mis omakorda soodustab pektinaaside ligipääsu pektiini polümeeridele (Mäe jt, 1995) Samas aga ei saa välistada võimalust, et CelS omab olulist roli ainult teatud kindlate peremeestaimede (mitte aga tubaka) nakatamisel.

1.2.3 Proteaasid

Proteaasid on ensüümide klass, mis hüdrolüüsivad valkude koostisesse kuuluvate aminohappejääkidevahelisi peptiidsidemeid. Eristatakse rakusiseseid ja – väliseid proteaase ehk vastavalt intra- ja ekstratsellulaarsed proteaase. *Pw* SCC3193 tüvi produtseerib lisaks pektinaasidele ja tsellulaasidele ka ekstratsellulaarset proteaasi, mille täpne funktsioon infektsiooniprotsessis ei ole siiani teada. Marits jt (1999) näitasid, et proteaas negatiivne tüvi oli kaotanud 40% oma virulentsusest võrreldes tüvega SCC3193 (Marits jt, 1999).

Praeguseks on teada, et *prrW* geeni ekspressioon saavutab maksimaalse taseme juba bakteri varajases kasvufaasis, täpsemalt logaritmilise kasvufaasi alguses. Sellest võib järeldada, et proteaaside üheks võimalikuks funktsiooniks on taime kaitsevalkude lagundamine (Marits jt, 1999). Seda hüpoteesi kinnitavad ka Vidal jt (1997) poolt saadud katsetulemused, mis näitasid, et *PrrW* tootmine korreleerub ajaliselt nakatunud taimes kaitsevalkude sünteesiga (Vidal jt, 1997). Taime resistentsuse kõrvaldamine on tähtsaim infektsiooni varajases staadiumis, kui patogeeni eksoensüümide (pektiini ja tselluloosi lagundavate ensüümide) tase pole veel piisavalt kõrge. Siiani ei ole õnnestunud tõestada, milline on konkreetne signaal, mis käivitab *prrW* ekspressiooni juba 4 tundi pärast infektsiooni. Potentsiaalseteks signaalmolekulideks võivad olla taimest pärit valgud, fenoolsed ühendid või muud vigastatud taime rakkudest erituvad ühendid (Marits jt, 2002).

1.2.4 Nip valk.

Mõned märgmädanikku põhjustavad *Pectobacterium* tüved produtseerivad ja sekreteerivad keskkonda lisaks PCWDE-dele taimerakule toksilisi valke, mis põhjustavad taimekoe nekroosi. Selliseid valke nimetatakse Nip valkudeks (ingl. k *necrosis inducing protein*). Mattinen jt (2004) tõestasid, et ka tüvi SCC3193 produtseerib Nip valku, mis põhjustab tubakataimedel lokaalset taimekoe nekroosi (Mattinen jt, 2004). Lisaks näitasid Mattinen jt. et *nip* mutandil on vähenenud võime tekitada märgmädanikku kartuli mugulas, kuigi mutandi pektinaaside ja tsellulaasi produktsioon olid võrreldavad tüvega SCC3193 (Mattinen jt, 2004). Nip valk integreerub taimeraku membraani ja kahjustab membraani niivõrd, et see põhjustab kahjustatud rakkude surma (Ottmann jt., 2009). Nip valku on kirjeldatud ka *Pectobacterium atroseptica* tüves SCRI1043, kus ta on samuti oluline virulentsusfaktor (Pemberton jt, 2005)

1.3 Virulentsusfaktorite regulatsioon

Virulentsusfaktorite regulatsioon on märgmädanikku põhjustavatel taimepatogeenidel väga tähtsal kohal, sest nagu eelpool mainitud, on taime edukaks nakatamiseks oluline kõikide virulentsusfaktorite kooskõlastatud süntees. Virulentsusfaktorite sünteesi nakatunud taimes mõjutavad nii mitmesugused taimest pärit keemilised ühendid (kaasa arvatud taime rakuseina laguproduktid) kui ka keskkonnatingimused, näiteks temperatuur, keskkonna pH ning vee, hapniku, fosfori ja lämmastiku kättesaadavus. Virulentsusfaktorite koordineeritud ja õigeaegne regulatsioon võimaldab patogeenil maha suruda taime kaitsevastus ja varustada järjest suurenevat patogeeni populatsiooni uute taimest pärit toitainetega (Toth jt, 2003). Nii *Pw*-l kui ka teistel märgmädanikku tekitavatel patogeenidel on PCWDE-de tootmine väga täpselt reguleeritud (Toth jt, 2003). *Pw*-s kontrollivad virulentsusfaktorite sünteesi nii globaalsed kui ka geenispetsiifilised regulatsioonisüsteemid (Murata jt, 1991; Pirhonen jt, 1991; Saarilahti jt, 1992). *Pw*-s on kirjeldatud nii positiivseid kui ka negatiivseid transkriptsiooni ja translatsiooni mõjutavaid regulaatorvalke, mis vasutavad virulentsusfaktorite õigeaegse ja koordineeritud sünteesi eest (Andersson jt, 1999; Chatterjee jt, 1995; Cui jt, 1995; Eriksson jt, 1998; Harris jt, 1998; Liu jt, 1993,1998,1999; Mukherjee jt, 1996, 1998; Pirhonen jt, 1991, 1993). Eduka nakatamise korral vabanevad PCWDE-de toimetel toitained, mida võivad lisaks märgmädanikku tekitavatele bakteritele kasutada ka teised oportunistlikud mikroorganismid ja teised mitte/pektolüütilised bakterid (Perombelon ja Salmond, 1995). Selleks, et suruda maha teiste konkureerivate bakterite paljunemist, produtseerivad mõned märgmädanikku põhjustavad bakterid sageli ka antibiootikume. Näiteks mõned *Pw* tüved toodavad antiobiootikumi karbapeneem (*carbapenem*), mille süntees on koordineeritud virulentsusfaktorite sünteesiga. Kuigi karbapeneem ei kahjusta taimerakke, annab ta patogeenile kasvueelise võrreldes taimes resideeruvate karbapeneem tundlike tüvedega (Toth jt, 2003).

1.3.1 Hulgatunnetus ehk quorum sensing

Hulgatunnetus (e. ingl. k *quorum sensing*) avastati enam kui 25 aasta eest merebakterites *Vibrio fischeri* ja *Vibrio harvey* (Nealson jt, 1979). Mõlema bakteri lutsiferaasi operon *luxCDABE* vastutas valgust produtseerivate ensüümide sünteesi eest (Engebrecht jt, 1984). Valgus eraldus vaid siis, kui bakteripopulatsioon oli saavutanud piisavalt suure arvukuse (10^6 rakku/ml) (Nealson jt, 1979). Hulgatunnetuse süsteemi kuulub LuxI valk (vastutab signaalmolekuli sünteesi eest) ja retseptorvalk LuxR (vastutab signaalmolekuli äratundmise eest) (Engebrecht jt, 1984, 1987). Signaalmolekuliks on tavaliselt L- homoseriin laktoon (OHHL), mida nimetatakse ka kui autoinduktor 1 (AI-1) ning mis teatud kontsentratsioonil

moodustab kompleksi retseptorvalguga LuxR. Selliselt aktiveeritud valk seondub tema poolt kontrollitavate geenide regulaatorpiirkonnaga (Loh jt, 2002). Hulgatunnetusel on tähtis roll ka paljudes märgmädanikku põhjustavates bakterites, kaasa arvatud *Pectobacterium* tüvedes (Pirhonen jt 1993; Pöllumaa jt, 2013). *Pw* tüves SCC3193 kuulub hulgatunnetuse süsteemi kolm valku: ExpI, mis osaleb autoinduktori sünteesil, ja kaks retseptorvalku - ExpR1 ja ExpR2. Tüves SCC3193 iseloomustatud regulatsioonisüsteem erineb tüüpilisest hulgatunnetuse süsteemist sellepoolest, et siin seonduvad regulaatorvalgud DNA-ga ilma autoinduktorita. Autoinduktori AI-1 puudumisel aktiveerib ExpR1/R2 *rsmA* transkriptsiooni, mis kodeerib globaalset RNA-ga seonduvat valku RsmA. AI-1 olemasolul aga blokeeritakse ExpR1 ja ExpR2. seondumine *rsmA* regulaatorpiirkonnaga. Seega kontrollib autoinduktor AI-1 eksoensüümide tootmist kaudselt, reguleerides *rsmA* geeni transkriptsiooni (Chatterjee jt, 2005; Cui jt, 2006). Praeguse regulatsioonimudeli kohaselt reguleerivad ExpI, ExpR1 ja ExpR2 valgud virulentsusfaktorite sünteesi kaudselt läbi Rsm süsteemi (Sjöblom jt, 2006).

1.3.2 Kahekomponentsed süsteemid

Kahekomponentsed regulatsioonisüsteemid (TCS – ingl k. *two component system*) mõjutavad virulentsusfaktorite produktsiooni vastavalt väliskeskkonnast ja/või ka raku seest tulevatele signaalidele (Hoch ja Silhavy, 1995). Tüüpiline TCS koosneb kahest valgust: sensorist ja vastuse regulaatorist, mis mõjutab tema poolt kontrollitavate geenide ekspressiooni (West ja Stock, 2001). *Pw*-s on kirjeldatud mitmeid TCS-d: ExpS-ExpA (Eriksson jt, 1998), PehR-PehS (Flego jt, 2000), PmrA-PmrB (Hyytiäinen jt, 2003) ja Rcs (Andresen jt, 2007). ExpS-ExpA on üks peamisi regulatsioonisüsteeme, mis on vajalik virulentsusfaktorite geenide aktiveerimiseks ja seega oluline ka *Pw* tüve SCC3193 patogeensuse tagamisel (Eriksson jt, 1998; Hyytiäinen jt, 2001). Vaatamata sellele, et ExpS/ExpA omab olulist rolli virulentsusfaktorite sünteesi kodeerivate geenide regulatsioonis, mõjutades kõikide PCWDE-de produktsiooni (Flego jt, 2000), ei ole siiani selge, milline signaal aktiveerib selle süsteemi. Kui ExpS/ExpA mõjutab tema poolt kontrollitavate geenide ekspressiooni positiivselt, siis teine kahekomponendiline Rcs süsteem on virulentsusfaktorite sünteesi negatiivne regulaator (Andresen jt, 2007). ExpS/ExpA ja Rcs süsteemid reguleerivad virulentsusfaktorite sünteesi, samas kui Hyytiäineni jt. (2003) poolt iseloomustatud PmrA/PmrB kahekomponendiline regulatsioonisüsteem kontrollib patogeeni elumust taimes (Hyytiäinen jt, 2003). Kui kõik eelpool mainitud kahekomponentsed regulatsioonisüsteemid kuuluvad nn. globaalsete regulatsioonisüsteemide hulka, siis PehR/PehS süsteem reageerib tsütoplasma välisele Ca^{2+} ja Mg^{2+} taseme muutustele ja kontrollib seeläbi *pehA* geeni poolt kodeeritud endopolügalakturonaasi produktsiooni (Saarilahti jt, 1992; Flego jt, 1997, 2000). ExpS/expA

ja Rcs süsteem mõjutavad virulentsusfaktorite sünteesi kaudselt läbi Rsm süsteemi (Hyytiäinen jt, 2001; Andresen jt, 2010), PehS/PehR ja PmrA/PmrB toimetehhanism ei ole siiani teada (Hyytiäinen jt, 2003).

1.3.3 KdgR

Virulentsusgeenide ekspressiooni *Pectobacterium* mõjutab KdgR valk, mis käitub kui negatiivne transkriptsiooniregulaator (Nasser jt, 1998). KdgR mõjutab virulentsusgeenide ekspressiooni nii otse, seondudes vastavate geenide promootorpiirkondadega ja takistades nende transkriptsiooni (Liu jt, 1999), kui ka kaudselt läbi teiste regulatsioonisüsteemide (Hyytiäinen jt, 2001). KdgR võime seonduda geeni promootorpiirkonnas oleva konsensusjärjestuse ehk KdgR-boxiga sõltub sellest, kas KdgR-ga on seondunud pektiini lagundamisel tekkinud vaheühend 2-keto-3-deoksüglükonaat (KDG). KDG seandumisel KdgR-iga moodustub inaktiivne kompleks, mis ei seonu KdgR-boxiga (Hugouvieux-Cotte-Pattat jt, 1996). Seega on KdgR-i ülesandeks pärssida virulentsusgeenide ekspressiooni, kui patogeen kasvab väljaspool peremeestaime (Liu jt, 1999) või kasvukeskkonnas puudub spetsiifiline signaalmolekul KDG.

1.3.4 FlhDC

Taime edukaks nakatamiseks on lisaks eksoensüümidele, mis taime rakukesta lagundavad, vajalik ka bakterite liikuvus, mis võimaldab patogeenil peremeestaimes kiiresti levida. (Perombelon, 2002). *Pw*-s ja ka paljudes teistes bakterites reguleerib viburite sünteesi kahest valgust koosnev kompleks FlhDC, mis käitub kui viburi sünteesiks vajalike geenide ekspressiooni mõjutav transkriptsiooni aktivaator (Wei jt, 2001). Praeguseks on selgunud, et FlhDC on oluline ka virulentsusfaktorite sünteesi regulatsioonis. Tema mõju virulentsusgeenide ekspressioonile on kaudne ja toimub läbi ExpS/ExpA süsteemi, milles ta aktiveerib *expA* geeni ekspressiooni (Chatterjee jt, 2009). Seega kontrollib FlhDC taimepatogeenides kahte protsessi: viburite ja virulentsusfaktorite sünteesi, mis mõlemad on patogeenile olulised peremeestaime nakatamisel (Chatterjee jt, 2009, 2010; Andresen jt, 2010).

1.4 Csr/Rsm süsteem bakterites

Csr (ingl k. *carbon storage regulator*) süsteem *E. coli*s ja Rsm (ingl k. *regulator of secondary metabolism*) süsteem teistes bakterites (*Pseudomonas*, *Pectobacterium* jt. enterobakterid) mõjutab geeniekspressiooni mRNA-de stabiilsuse kaudu (Romeo jt, 1993). Csr/Rsm süsteem võib mõjutada mRNA-de stabiilsust nii positiivselt kui ka negatiivselt (Romeo jt, 1998). Csr/Rsm süsteemide põhilisteks komponentideks on mRNA-seoselised valgud CsrA ja RsmA. Osades *Pseudomonastes* on lisaks RsmA-le ka teine mRNA-seoseline valk RsmE (Reimmann jt, 2005). Lisaks mRNA-seoselistele valkudele kuulub Csr/Rsm süsteemi ka üks või mitu regulaatorset sRNA-d, mis reguleerivad vaba CsrA/RsmA hulka rakus (Heroven jt, 2012).

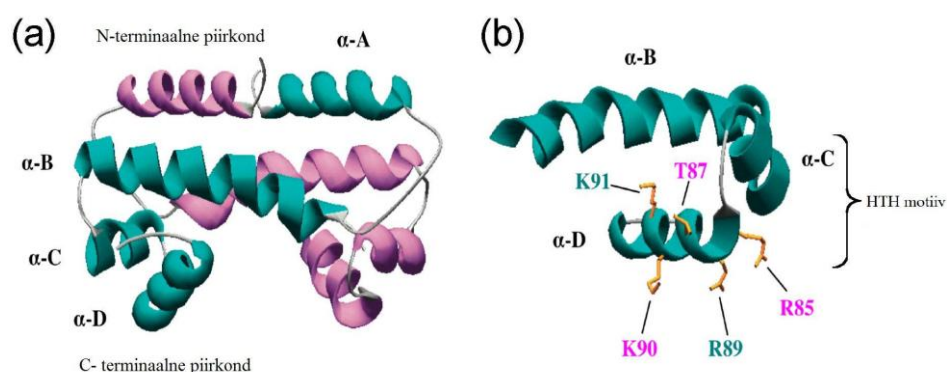
1.4.1 Rsm süsteem *Pectobacterium wasabiae*s

Rsm süsteem avastati *Pcc* tüves 71 kui negatiivne regulatsioonisüsteem, mis kontrollib virulentsusgeenide ekspressiooni (Chatterjee jt, 1995; Cui jt, 1995; Liu jt, 1998). Lisaks RsmA valgule kuulub Rsm süsteemi ka väike regulaatorne *rsmB* sRNA, mis reguleerib vaba RsmA hulka rakus (Chatterjee jt, 2002). *Pw* RsmA valk sarnaneb oma struktuuri ja mõju poolest *Pcc* tüves oleva RNA-seoselise RsmA valguga (Sjöblom jt, 2006). *Pcc* –s kirjeldati RsmA-d kui regulaatorvalku, mis kontrollib põhiliselt peremeestaimede nakatamiseks vajalike virulentsusgeenide ekspressiooni (Liu jt, 1998). Viimastel aastatel on selgunud, et RsmA funktsioon on tunduvalt laiem. Nii näitasid Kõiv jt (2013), et RsmA mõjutab *Pw* genoomis olevast 4571-st avatud lugemisraamist 396 ekspressiooni. Sealhulgas ka selliste geenide ekspressiooni, mis on vajalikud Tüüp VI sekretsioonisüsteemis, glükogeeni metabolismis, tsitraaditsükli teatud ühendite ja lipopolüsahhariidide sünteesil ning rakujagunemisel. Seega osaleb RsmA ka selliste füsioloogiliste protsesside regulatsioonis, mis on vajalikud patogeeni elumuse suurendamiseks nakatunud taimes. (Kõiv jt, 2013). Lisaks sellele on selgunud, et mitmed regulaatorid, nagu KdgR, ExpS/ExpA, ExpI/ExpR1/ExpR2 jt, mõjutavad virulentsusfaktorite sünteesi kaudselt läbi Rsm süsteemi (Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1996; Hyytäinen jt, 2001; Cui jt, 2008). Vaatamata RsmA olulisele rollile *Pcc* ja *Pw* tüvedes ei ole siiani suudetud katseliselt tõestada, kas RsmA seondub otse sihtmärkgeenide mRNA-dega või toimub see läbi teiste regulatsioonisüsteemide.

Rsm süsteem mõjutab virulentsusgeenide ekspressiooni otse, reguleerides nende translatsiooni. Samuti ka kaudselt, läbi teiste regulaatorite, mis mõjutavad virulentsusgeenide transkriptsiooni (Frolova, 2012 magistritöö). Kuna RsmA on RNA-seoseline valk, siis ei saa ta otse transkriptsiooni mõjutada, vaid peab tegema seda läbi mõne teise regulaatori. Meie laboris on varasemalt leitud, et RsmA mutandis on Fis-i ekspressiooni tase kõrge, seega võib arvata, et üheks selliseks regulaatorvalguks võib olla Fis valk.

1.5 Fis valk

Fis (ingl. k *factor for inversion stimulation*) on DNA-seoseline valk, mis osaleb nii DNA kokkupakkimisel, kuid lisaks sellele võib Fis käituda ka kui transkriptsiooniregulaator (Beach ja Osuna, 1998). Kõige põhjalikumalt on uuritud *E.coli* Fis valku. *E. coli* Fis valk koosneb neljast lühikeste pööretega eraldatud α -heeliksist ja β -lehtedest, mis moodustavad väljaulatuvaid juuksenõela struktuure. Fis valgu struktuur on ära toodud joonisel 1. Tulenevalt DNA-ga seonduvast Fis-i dimeeri struktuurist, saab Fis DNA-ga seonduda ainult seda painutades (Feldman-Cohen jt, 2006; Osuna jt, 1991).

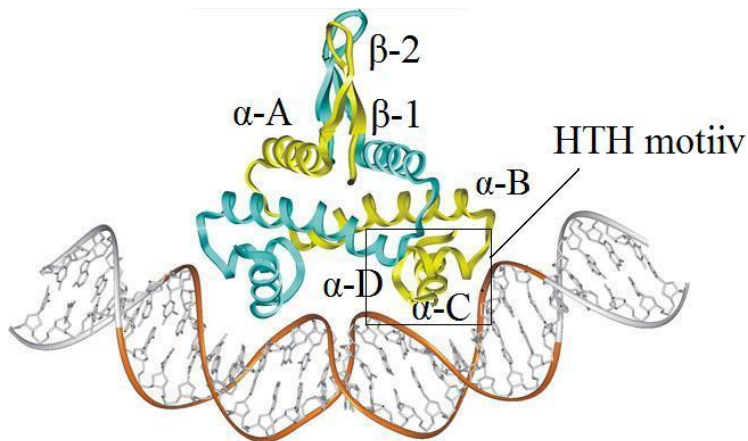


Joonis 1. Fis valgu struktuur. (a) Fis-i lindikujuline homodimeerne kristallstruktuur. Ühe Fis subühiku neli α -heeliksit (α -A, α -B, α -C ja α -D) on märgitud N-terminusest C-terminuseni. Subühikud on märgitud eri värvidega. (b) Fis valgu HTH DNA seondumismotiiv, mis koosneb α -C ja α -D helikaasidest. Fis-i jääkide kõrvalahelad R85, T87 ja K90 (märgitud roosaga) on vajalikud DNA järjestuste äratundmiseks ja Fis valgu seondumiseks erinevatele seondumisjärjestustele. Jäägid R89 ja K91 (märgitud rohelisega) panustavad seondumisaafiinsuse tagamisele (Shao jt, 2008).

1.5.1 Fis-i seondumine DNA-ga

E.coli Fis valku iseloomustab märkimisväärne võime seonduda nii spetsiifiliste kui ka mittespetsiifiliste DNA järjestustega (Ball jt, 1992). Fis-i seondumisjärjestus DNA-ga on nõrgalt konserveerunud. Lisaks mittespetsiifilisele seondumisele, moodustab Fis stabiilseid Fis-DNA komplekse ka väikese järjestusspetsiifikaga DNA segmentidega (Stella jt, 2010). Fis-i seondumise konsensusjärjestus *E. colis* on GNTYAAAWTTTRANC, kus Y on pürimidiin, R puriin, W adeniin või tümiin ning N mis tahes nukleotiid (Shao jt, 2008). *E.colis* on näidatud, et esmalt seondub Fis valk kõrgemalt konserveerunud järjestusega, seejärel vähem konserveerunud piirkondadega, kuniks Fis hakkab seonduma juhuslike DNA järjestustega (Feldman-Cohen jt, 2006). Cho jt (2008) mikrokiibi analüüsist selgus, et Fis-il on *E.coli* genoomis 894 seondumisregiooni, millest 33% asuvad kodeerivas alas (Cho jt, 2008).

Fis seondub DNA-ga HTH motiivi kaudu, mis paikneb iga subühiku C-terminaalses piirkonnas (Kostrewa jt, 1991; Safo jt, 1997). Kuna on leitud, et Fis valgu struktuur DNA-ga seondumisel ei muutu, siis ongi oluline just DNA paindumine, et saaks tekkida Fis-DNA kompleks (Stella jt, 2010). Shao jt (2008) tegid kindlaks, et mida enam on DNA ahela keskel adeniini (A) ja tümiini (T) rikkaid piirkondi, seda efektiivsem on seondumine, kuna keskne AT-rohkus tagab DNA parema painduvuse (Shao jt, 2008). On leitud, et Fis-i seondumisel DNA-ga, võib viimane painduda keskmiselt 40-50°, ulatudes maksimaalselt 90°-ni (Pan jt, 1996; Kostrewa jt, 1991). Fis-i seondumine DNA-ga on näidatud joonisel 2.



Joonis 2. Fis-DNA kompleksi mudel. Kaks HTH motiivi seonduvad DNA suurde vagumusse ja painutavad DNA heeliksit. Kollase ja sinisega on tähistatud erinevad subühikud. αA – αD tähistavad α-heelikseid ning β-1 ja β-2 tähistavad β-lehtesid. Kuldses märgitud DNA selgroog tähistab 21 bp-suurust minimaalset seondumissaiti (Skoko jt, 2006, modifitseeritud).

1.5.2 Fis transkriptsiooniregulaatorina

Fis on globaalne regulaator, mis reguleerib paljude bakterigeenide transkriptsiooni, käitudes kui aktivaator või repressor (Ninnemann jt, 1992). Fis mõjutab transkriptsiooni otseselt, kui ta seondub läbi DNA RNA polümeraasiga, takistades seega transkriptsiooni, või kaudselt, muutes teiste regulaatorgeenide ekspressiooni (Auner jt, 2003). Sealhulgas selliste geenide, nagu liikumine, energia metabolism, aminohapete ja nukleotiidide biosüntees ning toitainete transport (Bradley jt, 2007). Cho jt (2008) transkriptoomi analüüs näitas, et *E.coli* Fis-i eemaldamisel, oli mõjutatud 21% geenidest.

Fis-i tase rakus sõltub bakteri kasvufaasist ja kasvutingimustest. On teada, et Fis-i sünteesitakse suurtes kogustes eksponentsiaalses kasvufaasis ja eelkõige rikkal söötmel

kasvavates rakkudes (Ball jt, 1992; Ninnemann jt, 1992). Seejärel Fis-i tase väheneb ning rakkude statsionaarsesse kasvufaasi jõudes on Fis-i detekteerimine praktiliselt võimatu (Lautier ja Nasser, 2007) Seega on Fis-i ekspressioon kõrgeim madala bakteritiheduse korral. Lisaks repressseerib Fis ka PCWDE-de varajast sünteesi, eelkõige Pel-i (Lautier jt, 2007) ja tsellulaasi kodeeriva geeni *cel5* (Lautier ja Nasser, 2007) produktsiooni, et vältida nende ensüümide toimetel tekkivaid laguprodukte, mis annaksid peremehele märku patogeeni olmasolust rakus, veel enne kui bakter pole suutnud piisavalt paljuneda. Kui bakter on saavutanud piisava tiheduse ja on valmis peremeestaimet ründamiseks, siis rakus olev Fis-i kontsentratsioon langeb ning algab kiire PCWDE-de tootmine (Lautier ja Nasser, 2007). Lisaks sellele näidati *Dickeya dadantiis* (varasema süstemaatika järgi *Erwinia chrysanthemi*), et Fis valk aktiveerib ka viburite moodustumist, mis on vajalikud peremeestaimes levimiseks (Lautier ja Nasser, 2007). Lautier ja Nasser (2007) kirjeldasid Fis-i rolli *E. chrysanthemi* virulentsuses, konstrueerides Fis valku mittekodeeriva *fis* negatiivse mutandi. Selgus, et *fis* negatiivse mutandi haigusttekitav võime oli võrrelduna metsiktüvega vähenenud ning samuti ei tootnud mutant vibureid - oli liikumisvõimetu. *priC* geeni ekspressioon oli madalam ja *cel5* ekspressioon kõrgem kui *fis* geeni suhtes korrektne *E. chrysanthemi* tüvi. Pektaatlüaaside tootmine algab tavaliselt eksponentsiaalses kasvufaasis, kuid *fis* negatiivse mutandi puhul toodeti Pel-e alles bakteri statsionaarsesse kasvufaasi jõudes (Lautier ja Nasser, 2007). Fis valguga mõju virulentsusfaktorite sünteesile taimepatogeenis *Pectobacterium wasabiae* ei ole siiani uuritud.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Lautier ja Nasser (2007) näitasid, et *Fis* valk omab taimepatogeeni *Erwinia chrysanthemi*, uue süstemaatika kohaselt *Dickeya dadantii* virulentsuses olulist rolli. Proteaasi ja liikumisega seotud geenide ekspressioon oli *fis* negatiivses mutandis madalam kui korrektse tüves ning pektiinlühendite toodeti alles patogeeni statsionaarsesse kasvufaasi jõudes. Samas tsellulaasi kodeeriva *cel5* geenide ekspressioon oli suurenenud. Kokkuvõttes oli *fis* negatiivse mutandi virulentsus vähenenud.

Käesoleva töö eesmärgiks oli:

- konstrueerida *Pw* tüve SCC3193 *fis* negatiivne mutant,
- analüüsida *fis* mutatsiooni mõju *Pw* kasvule,
- võrrelda PCWDE sünteesi määravate geenide ekspressiooni SCC3193(*fis::Km*) mutandis ja *Pw* tüves SCC3193,
- võrrelda SCC3193(*fis::Km*) mutandi ja *Pw* tüve SCC3193 liikuvust,
- võrrelda SCC3193(*fis::Km*) mutandi ja tüve SCC3193 virulentsust katulimugulates.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Tüved ja plasmiidid

Tabel 1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

| Tüvi või plasmiid | Genotüüp, iseloomustus | Allikas, viide |
|--------------------------------|---|-----------------------------|
| <i>Pectobacterium wasabiae</i> | | |
| SCC3193 | Metsiktüvi | Pirhonen jt, 1988 |
| SCC3193(<i>fis</i> ::Km) | <i>fis</i> ::Km ^R | Käesolev töö |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| DH5α | <i>supE4</i> , Δ <i>lacU169</i> , (<i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>), <i>hasdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA</i> 96, <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> | Hanahan, 1983 |
| Plasmiidid | | |
| pMW119 | Amp ^R ; kloonimisvektor | Eurogentec |
| pMW119 <i>fis</i> | Praimeritega FisYXbaI ja FisASacI31 amplifitseeritud <i>fis</i> geen on kloonitud pMW119 vektorisse | Käesolev töö |
| pKD46 | Amp ^R ; Faag λ Red rekombinaasisüsteemi kodeeriv plasmiid | Datsenko ja Wanner, 2000 |
| pKD4 | 20 nt pikkust <i>Km</i> resistentsusgeeni homoloogiat sisaldav plasmiid | Datsenko ja Wanner, 2000 |

Tabel 2. Kasutatud parimerid. Restriksiooniensüümide lõikesaidid järjestuses on allajoonitud.

| Praimeri nimi | Praimeri järjestus (5' → 3') |
|---------------|------------------------------|
| M13 Fw | GTAAAACGACGGCCAGT |
| M13 Rev | AACAGCTATGACCATG |

| | |
|-----------|--|
| FisASac3I | TATAGAGCTCTTAACCCAAGAGGTAAAGCGC |
| FisYXbaI | TATATCTAGAGCGTAAACAGAAAAAGAGCTGACAG |
| FisYP1 | GCGTGAATTCTGACGTACTGACCGTTTCCACTGTAACTCTCAGGCTCAG GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC |
| FisAP2 | TGGTTACCGCGGGTGTATTGCATCACCATGTCCAACAGTGGCTGTTCAAC CATATGAATATCCTCCTTAG |

2.2.2. Söötmed ja kasvatamine

Pw rakke kasvatati temperatuuril 30°C, *E. coli* rakke temperatuuril 37°C. Rakke kasvatati LB vedelsöötmes, tardsöötme valmistamiseks lisati LB söötmele agarit (15g/l) (Sambrook ja Russell, 2001). Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil. Vajadusel lisati söötmetesse antibiootikume: ampitsilliin (Amp; 150µg/ml), kanamütsiin (Km; 25µg/ml). Kasvukõverate konstrueerimiseks ja ensüümiproovide kogumiseks kasvatati *Pw* tüvesid 30°C juures M9 minimaalsöötmes, mis sisaldas süsinikuallikana kas 0,2% glükoosi või 0,2% polügalakturoonhapet (PGA; Sigma) (Sambrook ja Russell, 2001).

2.2.3. PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon

PCR-i matriitsina kasutati rakulüsaati. Rakkude lüüsimiseks lisati 25µl-le steriilsele veele tikuotsaga rakke ning kuumutati 96°C juures 10 minutit. Seejärel rakud tsentrifuugiti 6000g juures (Eppendorf Centrifuge 5415R) ning PCR-i matriitsina kasutati DNA-d sisaldavat supernatanti.

PCR-i reaktsioonisegu üldmahuga 20µl sisaldas: 2µl 10x PCR puhvrit, 2µl 25mM MgCl₂, 0,4 µl 10mM dNTP mix-i (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,2µl Taq DNA polümeraasi (5U/µl; Prof. J. Sedman), 0,5 µl rakulüsaati või märklaud DNA-d, 0,4µl kumbagi praimerit ja lõppmahuni destilleeritud vett.

Fis geeni amplifitseerimiseks kasutati matriitsina *Pw* kromosomaalset DNA-d ja Pfu DNA polümeraasi (0,0125U/µl; Fermentas). Reaktsioonisegu lõppmahuga 20 µl sisaldas: 2µl 10x Pfu puhvrit, 2µl 25mM MgSO₄, 0,3µl *Pw* kromosoomi; muud komponendid ja nende mahud olid samad, mis Taq DNA polümeraasi kasutades (Eppendorf Mastercycler personal).

PCR-i etapid:

1. DNA esialgne denaturatsioon, polümeraasi aktiveerimine: 95°C 3min
2. DNA denaturatsioon: 95 °C 30sek
3. Praimerite seondumine DNA ahelaga: 53-55°C 30 sek

4. DNA süntees: 72°C 30 sek 2min

Etappe 2-4 korrati 25-30 korda

2.2.4 DNA geelelektroforees

DNA fragmentide olemasolu ja pikkuste kontrollimiseks kasutati geelelektroforeesi. PCR reaktsioonisegule lisati 1/10 üldmahust markervärvi, mis sisaldas 0,04% broomfenoolsinist 50%-lises glütseroolis. PCR-i proovi ja markervärvi segu kanti 1%-lisele agarosgeelile (1% agarooosi 1x TAE puhvris: 50mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas etiidumbromiidi (0,25µg/ml). Elektroforees toimus 100 voldi juures 1x TAE puhvris ning geeli ilmutati UV valguses.

2.2.5 Kloneerimine

pMW119*fis* konstrukti valmistamiseks amplifitseeriti *fis* geen *P_w* kromosoomilt restriksioonisaite sisaldavate praimeritega FisASacI31 ja FisYXbaI. Plasmidi pMW119 lõigati restriksioonidega *SacI* ja *XbaI*. Vektor ja fragment puhastati DNA Clean & ConcentratorTM-5 Kit'ga (Zymo Research, USA) ning ligeeriti kokku T4 DNA ligaasiga vastavalt tootja protokollile (Fermentas). Vektorisse pMW119 kloneeritud *fis* geeni järjestuse kindlaks tegemiseks sekveneeriti PCR-i fragment, mis saadi kasutades primereid M13 Rev ja M13 Fw.

2.2.6 Sekveneerimine

Kaheahelalise DNA järjestuse määramiseks kasutati Sangeri ensümaatilist meetodit, kus uute ahelate süntees peatatakse didesoksüribonukleotiididega (Sanger, 1977).

Eraldamaks PCR-i reaktsioonisegust kasutamata jäänud praimerid ja dNTP-d, lisati 5µl-le proovile 1µl aluselist fosfataadi FastAP (1U/µl) ja 0,2µl eksonukleas I (20U/µl). Proove töödeldi PCR masinas tingimustel: inkubeerimine 15 minutit 37°C, ensüümide inaktiveerimine 15 minutit 80°C.

Sekveneerimisproovide reaktsioonisegud üldmahuks 10µl, sisaldasid: 1 µl töödeldud PCR-i produkti, 2µl 5x lahjendamispuhvrit, 0,7µl premix, 0,4µl praimerit M13 Rev või M13 Fw, üldmahuni destilleeritud vett. Proove töödeldi PCR-i masinas tingimustel:

1. DNA denaturatsioon 95°C 15 sek
2. Praimeri seondumine 55°C 15 sek
3. DNA süntees 60°C 1 min

Tükleid korrati 30 korda.

Saadud proovid sadestati, lisades neile 2µl dekstraani (10mg/ml) ning 30µl 96% külma filtreeritud etanooli (2,5 mahtu) ning hoiti 15 minutit -20°C juures. Seejärel poove

tsentrifuugiti 10 minutit 13000g juures, eemaldati etanool ning sadet pesti 2 korda 200µl 70% piiritusega. Sademelt eemaldati täielikult etanool, lasti õhu käes kuivada, misjärel sade lahustati 10 µl-s 70%-lises formiaadis ning säilitati -20°C juures.

Proovid sekveneeriti TÛMRI automaatsekvenaatoril (Applied Biosystems). Saadud tulemuste analüüsiks kasutati programmi „BioEdit 7.2.2“ ja võrreldi NCBI GenBank andmebaasis olevate järjestustega, kasutades programmi blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2.7 Transformatsioon, elektroporatsioon

Plasmiid pMW119*fis* viidi transformatsiooniga DH5α tüvesse, kasutades Inoue jt (1990) meetodit. *E. coli* DH5α rakke kasvatati SOB vedelsöötmes temperatuuril 18°C, tiheduseni OD₆₀₀~0.6 ning seejärel töödeldes rakke TB puhvri (10 mM Hepes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂: pH 6.7) ja dimetüülsulfoksiidiga (lõppkonts. 7%) ning säilitati temperatuuril -80°C.

Kompetensetesse *E. coli* DH5α rakkudele lisati 10µl ligeerimisseguga, hoiti 20 minutit jääl, seejärel tehti kuumašokk 42°C juures 1min ja 20 sekundit ning asetati koheselt viieks minutiks tagasi jääle. Lisati 1ml LB söödet ning kasvatati 37°C juures 45-60 minutit. Rakud plaaditi LB tardsöömele, kuhu oli lisatud selektsiooniks vajalik Amp, 40µl IPTG-d (100mM) ja 40µl X-Gal-i (40ng/µl) kolooniate kontrollimiseks sini-valge-testi abil.

Plasmiidide pMW119 ja pMW119*fis* transformeerimiseks *Pw* tüvesse SCC3193 ja *Pw* SCC3193(*fis*::Km) kasutati elektroporatsiooni. Bakterirakke kasvatati LB vedelsöötmes kuni OD₆₀₀ ~0.4, pesti kolm korda 10% steriilse glütserooliga, suspendeeriti 50 µl samas lahuses, lisati plasmiidne DNA (~10 ng) ning elektroporeeriti BIO-RAD Pulser-iga (USA) pingel 2,5 kV.

2.2.8 Ekstratsellulaarsete enüümide aktiivsuse määramine

Ekstratsellulaarsete ensüümide määramiseks kasvatati kultuure üleöö 5ml-s LB söötmes, kuhu vajadusel oli lisatud sobiv antibiootikum. Hommikul võrdsustati kultuurid tiheduseni OD₅₈₀ ~0,05 ning kasvatati 30°C juures loksutil 30ml-s M9 minimaalsöötmes, kus süsinikuallikaks oli kas glükoos (0,2%) või PGA (0,2%). Iga kahe tunni möödudes eemaldati 1ml söödet, tsentrifuugiti 6000g juures 5 minutit. Saadud supernatant (edaspidi nimetatud kui proov) pipeteeriti uude Eppendorfi tuubi, säilitati -20°C juures ning kasutati hiljem ekstratsellulaarsete ensüümide määramiseks.

Pel-i määramiseks oli vaja esmalt valmistada substraat, mis sisaldas ühe proovi kohta 13,6µl 1%-list PGA-d, 1,4µl 100mM CaCl₂ ja 0,03µl 1M Tris puhvrit (pH 8,5). Ensüümi aktiivsuse määramiseks võeti 3µl proovi, millele lisati 15µl substraati, misjärel proove inkubeeriti 1 tund

37°C juures. Järgnevalt lisati proovile 71µl 0,5M HCl-i ja 142µl 10mM TBA-d, inkubeeriti 1 tund 97°C juures. Seejärel tsentrifuugiti proove 3000g juures ning 200µl supernatanti pipeteeriti mikrotiiterplaadile ja mõõdeti proovi optiline tihedus 548nm juures (Infinite M200 PRO, Tecan).

Peh-i määramiseks pipeteeriti mikrotiiterplaadile 5µl proovi. Lisati 45µl Peh puhvrit ja 50µl 1% PGA-d ning hoiti 30 minutit toatemperatuuril. Reaktsiooni peatamiseks pipeteeriti 27µl reaktsioonisegu 27µl-le vasereaegendile. Kuumutati 15 minutit 97°C juures ja jahutati. Lisati 27µl värvilahust ja pipeteeriti mullitamise lõppemiseni. Lisati 162µl vett ning tsentrifuugiti 3000g juures 10 minutit. 200µl supernatanti pipeteeriti mikrotiiterplaadile ja mõõdeti OD 500nm juures.

Peh puhver lõppmahus 100ml sisaldab: 11,1ml 4M NaCl, 11,1ml naatriumatsetaat, 888µl 0,5M EDTA (pH 8) ja 76,8ml H₂O.

Vasereagent lõppmahus 1 liiter sisaldab: 24g Na₂CO₃ ja 12g kaltsium-naatrium-tartraati lahustununa 250ml-s vees, millele on lisatud 40ml 10% CuSO₄*5H₂O, 16g NaHCO₃, 18g Na₂SO₄ ja mahuni vett.

Peh värvilahus sisaldab 25g ammooniummolübdaati lahustununa 450ml vees, kuhu on lisatud 21 ml kontsentreeritud H₂SO₄ ning eraldi 500ml-s vees lahustatud 3g Na-arsenaati

Prt-i määramiseks valmistati segu, mis sisaldas ühe proovi kohta 35µl 2%-list azokaseiini ja 15µl 1M Tris (pH 8). Eppendorfi tuubi pipeteeriti 100µl proovi ja 50µl segu. Inkubeeriti 4 tundi 30°C juures. Nelja tunni möödudes peatati reaktsioon 75µl 14% perkloorhappega, tsentrifuugiti 3000g juures 10 minutit. 150µl supernatanti pipeteeriti mikrotiiterplaadile, lisati 15µl 10M NaOH-d ning mõõdeti OD 436nm juures.

2.2.9 *Fis* negatiivse mutandi konstrueerimine

Fis negatiivse mutandi SCC3193(*fis*::Km) konstrueerimiseks kasutati Datsenko ja Wanner (2000) meetodit, kus kromosomaalne geen katkestatakse homoloogilise rekombinatsiooni teel, kasutades lineraarset DNA fragmenti (Datsenko ja Wanner, 2000).

Esmalt konstrueeriti oligonukleotiidid *Fis*YP1 ja *Fis*AP2, kus praimerite järjestus on 50 bp ulatuses komplementaarne *fis* geeni järjestusega ja 20 bp ulatuses Km resistentsusgeeniga, mida sisaldab pKD4 plasmiid.

Elektroporatsiooniks kompetentsete rakkude saamiseks kasvatati Red rekombinaasisüsteemi kodeerivat plasmidi pKD46 sisaldavaid *Pw* rakke üleöö 5ml-s LB-s 30°C juures. Hommikul tehti 1:50 lahjendus 50ml SOB söötmesse, mis sisaldas ka arabinoosi (lõppkontsentratsiooniga 10mM) ja kasvatati 30°C juures tiheduseni OD₅₅₀~0,8. Seejärel

rakud tsentrifuugiti 6000g juures ja eemaldati supernatant. Rakke pesti 3 korda 10% glütserooliga ning võeti üles 30µl-s 10% glütseroolis (geneetika labor).

PCR produktid genereeriti praimeritega FisYP1 ja FisAP2, kus matriitsina kasutati Km sisaldavat pKD4 plasmidi. Saadud PCR produkt puhastati DNA Clean & ConcentratorTM-5 Kit'ga (Zymo Research, USA) mõõdeti kontsentratsioon ning kvaliteet, kasutades Infinit Pro 200 (Tecan). Viidi läbi elektroporatsioon eelnevalt valmistatud kompetentssetesse *Pw* pKD46 rakkudesse.

Selleks lisati 30µl-le rakkudele 1µl PCR-iga genereeritud produkti, DNA-rakkude segu pipeteeriti eelnevalt jääl jahutatud küveti ja elektroporeeriti BIO-RAD Pulseriga pingel 2,5kV. Vahetult pärast elektroporatsiooni lisati 1ml LB + 1M MgSO₄ (2% üldmahust) söödet ning kasvatati 30°C juures 1 tund. Seejärel rakud plaaditi Km sisaldavale tardsöötmele ning jäeti 30°C juurde kasvama. Tekkinud kolooniad külvati paralleelselt Km ja PGA-d sisaldavatele tassidele, et eristada Km-resistentsed *fis* negatiivsed mutante (*fis::Km*). Km resistentsuse olemasolu kontrolliti ka PCR-iga, kasutades selleks primereid FisYP1 ja FisAP2.

2.2.10 Liikuvuse testimine

Liikuvuse testimiseks kasvatati tüvesid üleöö 5ml-s LB söötmes, kuhu vajadusel oli lisatud sobiv antibiootikum. Hommikul kultuuride tihedused võrdustati OD₅₈₀~1 ning 2µl kultuuri pipeteeriti tassidele, mis sisaldasid lisaks kartuliekstrakte (0,4%, Formedium) ka 0,25% agarit.

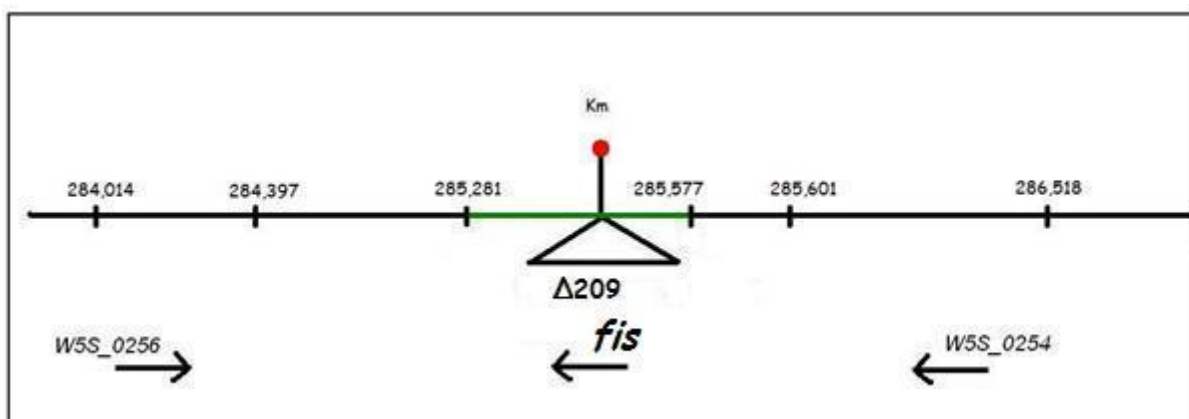
2.2.11 Virulentsuse testimine

Nakatamiseks sobilike kartulite saamiseks hoiti kartuleid üleöö vees. Hommikul kartuleid steriliseeriti 10 minutit 10%-lise puhastusvahendilahusega (Ace), hoiti 5 minutit 96%-lises etanoolis ning seejärel pesti kaks korda destilleeritud veega.

Virulentsuse testimiseks kasvatati *Pw* tüvesid SCC3193 ja SCC3193(*fis::Km*) üleöö 5ml-s LB-s, kuhu vajadusel oli lisatud Km. Hommikul pipeteeriti 500µl mõlemast kultuurist Eppendorfi tuubi ning rakud tsentrifuugiti 2000g juures põhja. Supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti 10mM MgSO₄ –s tiheduseni OD₅₈₀~1. Seejärel kartuleid nakatati 30µl-i kultuuriga ning asetati plastmassist karpidesse, niisutatud filterpaberile. Mugulaid inkubeeriti toatemperatuuril 48tundi. 48h möödudes lõigati kartulid pooleks, eemaldati ning kaaluti matsereerunud taimekude.

2.3 Tulemused ja arutelu

Lautier ja Nasser (2007) poolt avaldatud andmetest oli teada, et Fis mõjutab virulentsusfaktorite sünteesi taimepatogeenis *Erwinia chrysanthemi*. Nimetatud uurimisrühm konstrueeris *E. chrysanthemi* *fis* negatiivse mutandi ning näitas, et mutandi võime nakatada kartulimugulaid või sigurilehti oli võrreldes metsiktüvega vähenenud. Lisaks oli teada, et *Pw* tüves SCC3193 mõjutab globaalne regulaator RsmA lisaks virulentsusfaktoritele ka *fis* geeni ekspressiooni (Kõiv jt, 2013). Selleks, et uurida Fis valgu mõju virulentsusgeenide ekspressioonile, konstrueerisin oma töö esimeses etapis *Pw* tüve SCC3193 *fis* negatiivse mutandi SCC3193(*fis*::Km). Selleks deleteerisin *fis* geenis piirkonna +13 - +222 ja asendasin selle Km geeniga nagu näidatud joonisel 3.

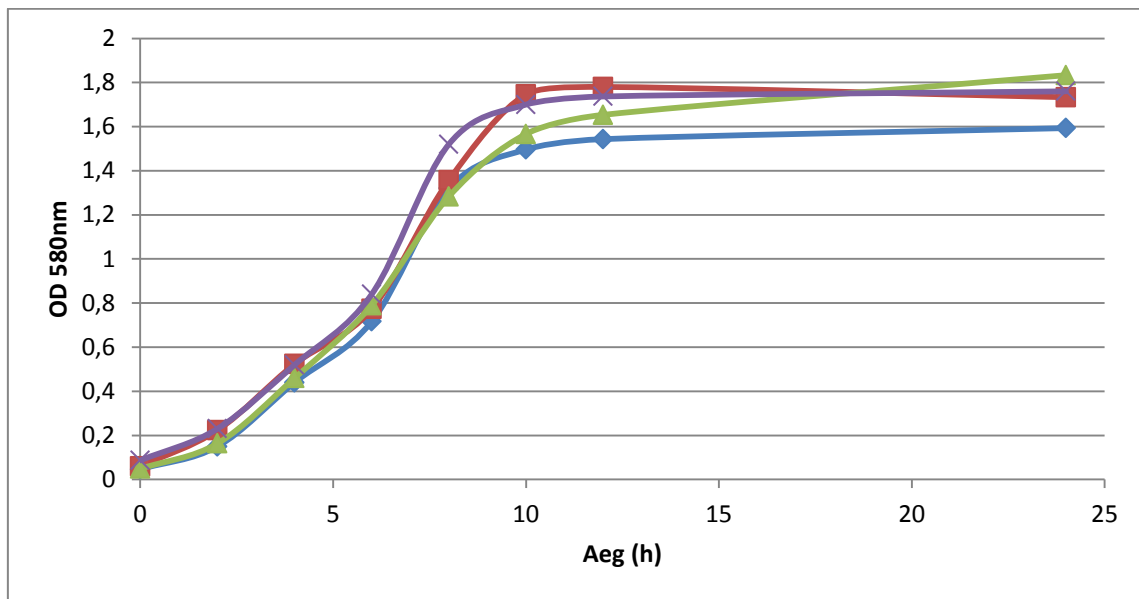


Joonis 3. Fis geeni katkestamine *Pw* tüve SCC3193 kromosoomis. Joonisel on esitatud *fis* geeni lokalisatsioon tüve SCC3193 kromosoomis. Lisaks *fis* geenile on joonisel äratoodud ka *fis* geeniga külgnevad kromosoomi piirkonnad (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/385869619?report=graph>). Nooled tähistavad geenide transkriptsiooni suundasid ja numbrid aluspaare. Δ209 märgib deletsiooni suurust *fis* geenis, Km kanamütsiini resistentsust määrav geen.

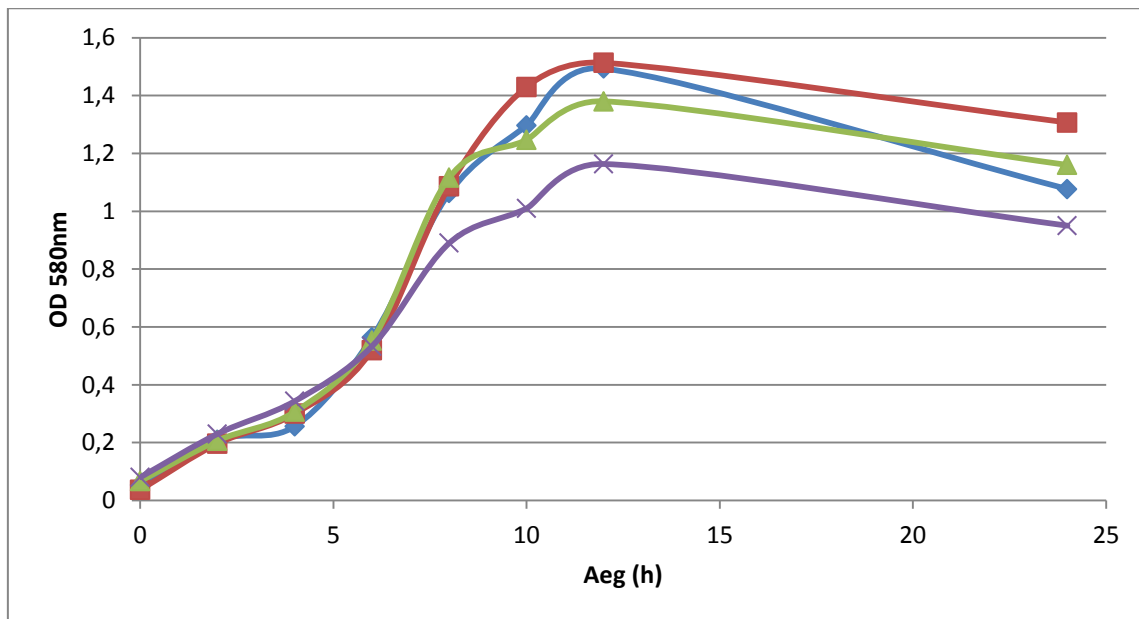
2.3.1 Fis valk ei mõjuta bakteritüvede kasvu

Fis valk kuulub nn. globaalsete regulaatorite hulka ja kontrollib/mõjutab paljude füsioloogiliste protsesside toimumist rakus (Cho jt, 2008). Selleks, et selgitada, kas muutused *fis* mutandi virulentsuses on põhjustatud Fis valgu puudumisest või tulenevad tüvede SCC3193 ja SCC3193(*fis*::Km) erinevast kasvust, võrdlesin nende tüvede kasvukiirusi minimaalsöötmes M9, kus süsinikuallikana kasutati kas 0.2% glükoosi või 0.2% PGA-d. Nagu joonistelt 4 ja 5 näha, ei erinenud SCC3193(*fis*::Km) mutandi kasvukiirus oluliselt tüve SCC3193 kasvukiirusest, samuti ei mõjutanud plasmidi pMW119*fis* viimine SCC3193(*fis*::Km) mutanti selle kasvu vedelsöötmes.

Pw tüve SCC3193, *Pw fis* negatiivse mutandi SCC3193(*fis::Km*) ja *Pw* SCC3193(pMW119*fis*) kasvukarakteristikute omavahelisel võrdlusel selgus, et *Fis* valgu puudumine või üleekspressioon ei avalda negatiivset mõju bakterite kasvule ei glükoosi (0,2%) ega PGA-d (0,2%) sisaldavas söötmes. *Fis* valgu efekti puudumine kasvukiirusele on kooskõlas Lautier ja Nasser (2007) poolt saadud tulemustega, kus nende poolt konstrueeritud *Erwinia chrysanthemi fis* negatiivse mutandi kasvukiirus ei erinenud metsiktüve kasvukiirusest (Lautier ja Nasser, 2007).



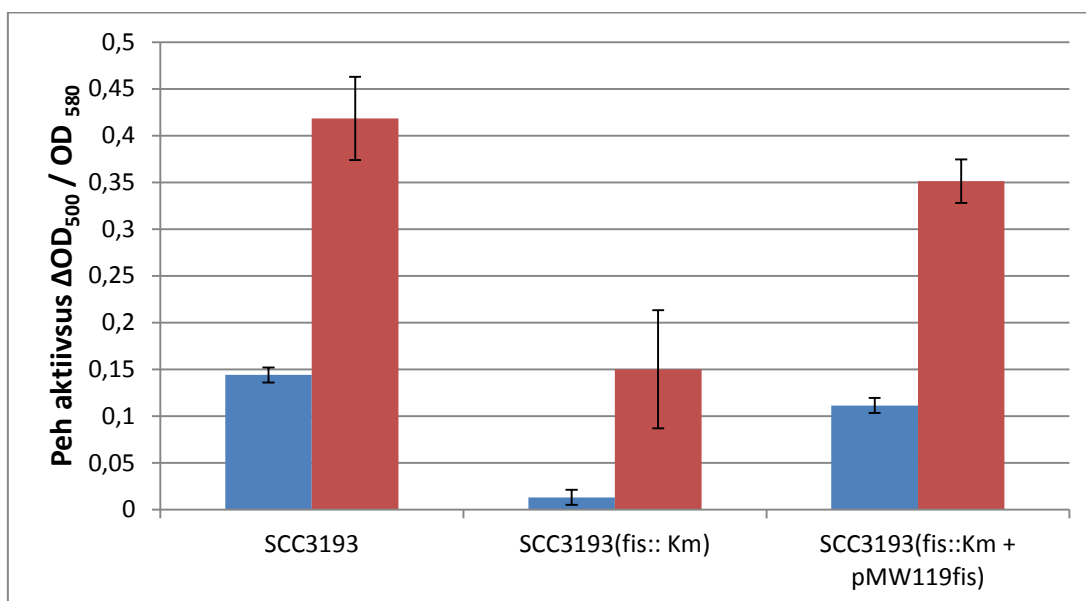
Joonis 4. *Pw* tüvede SCC3193(—), SCC3193(*fis::Km*)(—), SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*) (—) ja SCC3193(pMW119*fis*) (—) kasvukõverad glükoosi (0,2%) sisaldaval minimaalsöötmel M9. Graafikul on toodud bakterikultuuride tihedused aja lõikes. Graafikutel näidatud tulemused on kolme teineteisest sõltumatu katse keskmised. Standardhälve pole joonisel selguse huvides näidatud, kuid see ei ületa ühelgi juhul 10% väärtusest.



Joonis 5. *Pw* tüvede SCC3193(—○—), SCC3193(*fis::Km*)(—■—), SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*) (—▲—) ja SCC3193(pMW119*fis*) (—×—) kasvukõverad polügalakturonaasi (PGA, 0,2%) sisaldaval minimaalsöötmel M9. Graafikul on toodud bakterikultuuride tihedused aja lõikes. Graafikutel näidatud tulemused on kolme teineteisest sõltumatu katse keskmised. Standardhälve pole joonisel selguse huvides näidatud, kuid see ei ületa ühelgi juhul 10% väärtusest.

2.3.2 Fis valgu mõju virulentsusfaktorite sünteesile

Töö järgmises etapis püüdsin välja selgitada, kas Fis mõjutab taime rakuseina lagundavate ensüümide sünteesi *Pw* tüves SCC3193. Selleks külvasin SCC3193(*fis::Km*) ja SCC3193 indikaatortassidele, mis võimaldavad hinnata patogeeni poolt produtseeritavate pektinolüütiliste (PGA-d sisaldavad LB söötmega tassid), tsellulolüütiliste (CMC sisaldavad LB-tassid) ja proteolüütiliste (kaseiini/piimavalku sisaldavad LB-tassid) ensüümide produktsiooni. Katsetest saadud tulemused näitasid, et kui pektinolüütiliste ja proteolüütiliste ensüümide tase SCC3193(*fis::Km*) oli vähenenud võrreldes tüvega SCC3193, siis tsellulolüütiliste ensüümide tase SCC3193(*fis::Km*) ei olnud oluliselt langenud võrreldes tüvega SCC3193 (andmed pole näidatud). Fis valgu mõju täpsemaks hindamiseks virulentsusfaktorite produktsioonile, määrasin polügalakturonaasi, pektaatlüaaside ja proteaasi produktsiooni tüves SCC3193(*fis::Km*) ja algtüves SCC3193 kvantitatiivselt. Joonisel 6 on näha, et SCC3193(*fis::Km*) negatiivses mutandis on vähenenud polügalakturonaasi aktiivsus võrreldes tüvega SCC3193 nende kasvatamisel nii mitteindutseeritud (0,2% glükoos) kui ka indutseeritud tingimustes (0,2% PGA) vastavalt 11 ja 3 korda. SCC3193(*fis::Km*) mutandis taastus polügalakturonaasi produktsioon, kui sellesse viisin plasmiididga pMW119 funktsionaalse *fis* geeni (pMW119*fis*; joonis 6).

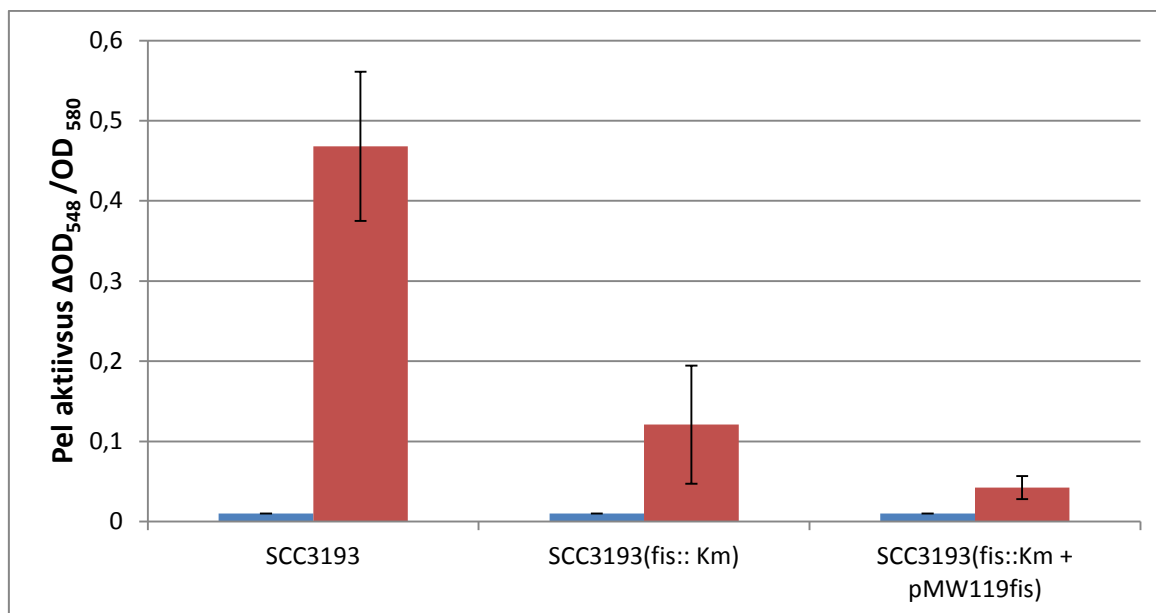


Joonis 6. Polügalakturonaasi produktsioon *Pw* tüvedes SCC3193, SCC3193(*fis::Km*) ja SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*) minimaalsöötmes M9 indutseeritud (0.2% PGA; ■) ja mitteindutseeritud (0.2% glükoosi; ■) tingimustes avaldatuna optilise tiheduse muutusena rakutiheduse kohta. Ensüümide aktiivsus on määratud eksponentsiaalses kasvufaasis 6h möödudes. Graafikutel näidatud tulemused on kolme teineteisest sõltumatu katse keskmised. Näidatud on standardhälve.

Pektaatlüaaside produktsioon SCC3193 tüves on suurem kui mutandis SCC3193(*fis::Km*) (joonis 7). Glükoosi (0,2%) sisaldavas söötmes tootsid nii SCC3193 kui ka SCC3193(*fis::Km*) mutant pektaatlüaase minimaalsel määral, PGA-d (0,2%) sisaldavas söötmes aga produtseeris SCC3193(*fis::Km*) mutant peaaegu neli korda vähem Pel-i kui SCC3193 tüvi (joonis 7). *Fis* geeni sisaldava konstrukti (pMW119*fis*) sisseviimisel SCC3193 tüvesse pektaatlüaaside tootmine ei taastunud (joonis 7).

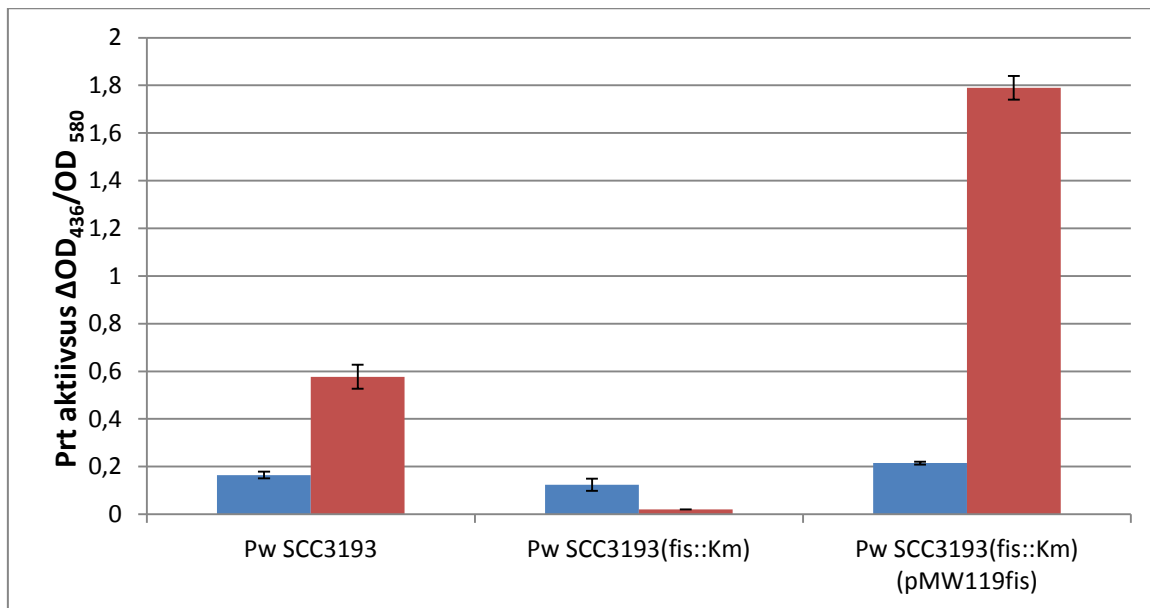
Minu tulemustest näeme, et lisaks polügalakturonaasile mõjutab *Fis* valk ka teise tähtsa rühma - pektiini lagundavate ensüümide, pektaatlüaaside - produktsiooni. Mõlemal juhul käitub *Fis* kui positiivne regulaator, sest nii polügalakturonaasi kui ka pektaatlüaaside produktsioon on SCC3193(*fis::Km*) mutandis oluliselt vähenenud võrreldes tüvega SCC3193 (joonis 6,7). Kui plasmidi pMW119*fis* viimisel tüvesse SCC3193(*fis::Km*) taastus polügalakturonaasi produktsioon (joonis 6), siis pektaatlüaaside produktsioon ei taastunud (joonis 7). See võib olla seletatav asjaoluga, et *Fis* valgu hulk/kontsentratsioon on rakus väga täpselt reguleeritud. Kuigi me kasutasime komplementatsiooni katsetes madala koopiaarvuga plasmidi pMW119, on pMW119*fis* plasmidi viimisel rakku *Fis* valgu kontsentratsioon

kõrgem kui algtüves SCC3193. Saadud tulemustest võib järeldada, et polügalakturonaasi sünteesi määrav geen ei ole *Fis* valgu hulga kõikumise suhtes rakus nii tundlik kui pektaatlüaaside sünteesi määravad geenid.



Joonis 7. Pektaatlüaasi produktsioon *Pw* tüvedes SCC3193, SCC3193(*fis::Km*) ja SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*) minimaalsöötmes M9 indutseeritud (0,2% PGA; ■) ja mitteindutseeritud (0,2% glükoosi; ■) tingimustes avaldatuna optilise tiheduse muutusena rakutiheduse kohta. Ensüümide aktiivsus on määratud eksponentsiaalses kasvufaasis 6h möödudes. Graafikutel näidatud tulemused on kolme teineteisest sõltumatu katse keskmised. Näidatud on standardhälve.

Fis geeni inaktivatsioon põhjustas lisaks pektiini lagundavate ensüümide produktsiooni langusele ka proteaasi produktsiooni vähenemist. Indutseeritud tingimustes (0,2% PGA) on SCC3193(*fis::Km*) tüve proteaase aktiivsus vähenenud peaaegu 29 korda võrreldes tüvega SCC3193 (joonis 8). Sarnaselt polügalakturonaasile, taastus ka proteaasi korral SCC3193(*fis::Km*) mutandi proteaasne aktiivsus, kui viisin antud tüvesse sisse *fis* geeni üleekspressiooni konstrukti (pMW119*fis*). Sealjuures väärib märkimist, et pMW119*fis* konstrukti viimisel SCC3193(*fis::Km*) mutandi proteaasi produktsioon mitte ainult ei taastunud, vaid isegi ületas proteaasi produktsiooni tüves SCC3193 ligikaudu kolm korda, kui baktereid kasvatati indutseeritud tingimustes (0,2% PGA; joonis 8). Seega sarnaselt pektaatlüaaside produktsioonile, võib ka proteaasi sünteesi kodeeriv geen olla *Fis*-i kontsentratsioonist sõltuv. *Fis* valku toodetakse enim bakteri eksponentsiaalses kasvufaasis, mil toimub ka taime kaitsevastuse mahasurumine. Seega võib kõrvalekalle optimaalsest *Fis*-i tasemest rakus olla patogeenile täiendavaks märguandeks taimest ning algab massiline proteaaside tootmine.



Joonis 8. Proteaasi produktsioon *Pw* tüvedes SCC3193, SCC3193(*fis::Km*) ja SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*) minimaalsöötmes M9 indutseeritud (0.2% PGA, ■) ja mitteindutseeritud (0.2% glükoosi, ■) tingimustes avaldatuna optilise tiheduse muutusena rakutiheduse kohta. Ensüümide aktiivsus on määratud eksponentsiaalses kasvufaasis 6h möödudes. Graafikutel näidatud tulemused on kolme teineteisest sõltumatu katse keskmised. Näidatud on standardhälve.

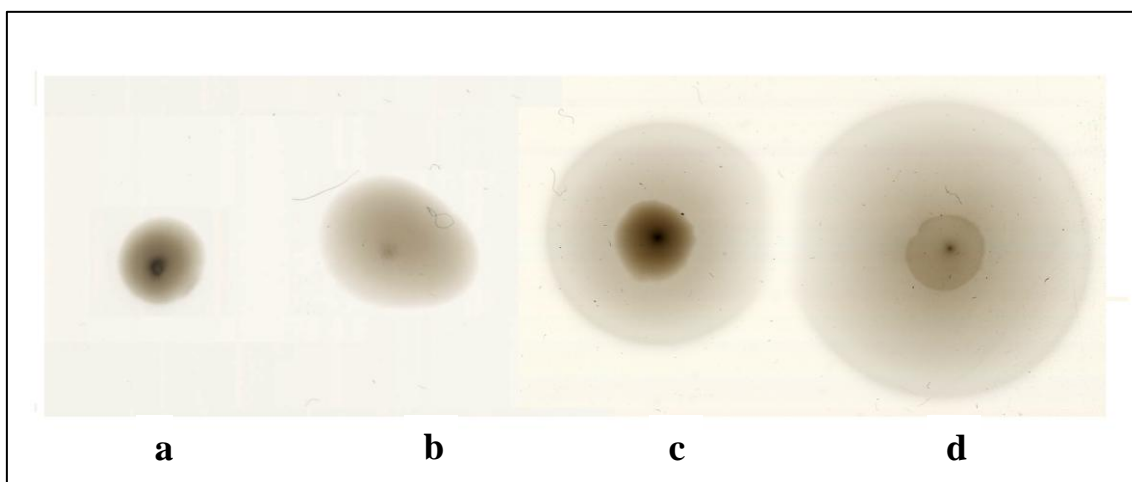
Minu katsete tulemused näitasid, et SCC3193(*fis::Km*) mutandis olid nii indutseeritud kui ka mitteindutseeritud tingimustes taime rakuseina lagundavate ensüümide (v.a. tsellulaasi) produktsioon vähenenud, võrreldes tüvega SCC3193. Kõige rohkem mõjutas *fis* geeni inaktiveerimine proteaasi produktsiooni PGA-d (0,2%) sisaldaval söötmel, kus vahe SCC3193 ja SCC3193(*fis::Km*) proteaasi produktsioonil oli pea kolmkümmend korda, glükoosi (0,2%) sisaldaval söötmel oli vahe vaid pooleteisekordne (joonis 8). Teiste virulentsusfaktorite produktsioon oli samuti vähenenud. Peh aktiivsus 11 ja 3 korda vastavalt glükoosi (0,2%) ja PGA-d (0,2%) sisaldaval söötmel (joonis 6) ning Pel aktiivsus neli korda 0,2%-list PGA-d sisaldaval söötmel (joonis 7). Pel- i aktiivsus nii SCC3193 kui ka SCC3193(*fis::Km*) glükoosi (0,2%) sisaldaval söötmel oli minimaalne (joonis 7). Kokkuvõttes, kui võrrelda katsetulemusi indutseeritud ja mitteindutseeritud tingimustes (joonised 6,7,8) näeme, et erinevused ensüümiaktiivsustes ilmnevad markantsemalt just siis, kui rakke kasvatada indutseeritud tingimustes (0.2% PGA), mis osaliselt imiteerivad patogeeni kasvukeskkonda taimes.

Varem on näidatud, et Fis valk omab mõningast rolli ka virulentsusfaktorite regulatsioonis *E. chrysanthemi* tüves 3937 (Lautier ja Nasser, 2007). Lautier ja Nasser (2007) tulemused

näitasid, et võrreldes *E. chrysanthemi* metsiktüvega, oli antud tüve *fis* negatiivsel mutandil vähenenud proteaaside tootmine, suurenenud tsellulaasi kodeeriva geeni *cel5* ekspressioon ja tsellulaasne aktiivus ning pektaatlüaside produktsioon oli bakteri eksponentsiaalses kasvufaasis inhibeeritud, kuid statsionaarses kasvufaasis oli *fis* mutandi pektaatlüaside produktsioon suurem kui tüves 3937 (Lautier ja Nasser, 2007). Kui võrrelda omavahel *Pw* SCC3193 ja *E. chrysanthemi fis* negatiivseid mutante, siis selgub, et *fis* geen on mõlemal juhul proteaaside produktsiooni positiivne regulaator. Kui *Pw* SCC3193 tüves ei esinenud vahet tsellulaaside tootmisel võrrelduna SCC3193(*fis::Km*) tüvega, siis *E. chrysanthemi* mõjutab *fis* geen tsellulaaside produktsiooni negatiivselt (Lautier ja Nasser, 2007). Ka Pel-ide produktsiooni mõjutab Fis valk *Pw* tüves SCC3193 ja *E. chrysanthemi* tüves 3937 erinevalt. Käesolevas töös mõõdeti *Pw* SCC3193 ja SCC3193(*fis::Km*) Pel-ide produktsiooni bakteri eksponentsiaalses kasvufaasis ning võrrelduna *E. chrysanthemi fis* negatiivse mutandi eksponentsiaalses kasvufaasis toodetud Pel-idega muutusi ei täheldatud – mõlemal juhul käitub Fis valk kui pektaatlüaside produktsiooni positiivne regulaator.

2.3.3 Fis valgu mõju liikuvusele

Paljude nii looma- kui taimepatogeenide oluliseks virulentsusfaktoriks on nende võime liikuda, mis võimaldab neil kiiresti nakatunud peremeesorganismis levida. Ka *Pw*-s on PCWDE-de ja viburi moodustumiseks vajalike valkude süntees reguleeritud mitmete ühiste regulatsioonisüsteemide poolt (Harris jt, 1998). Järgnevalt testisin, kas Fis mõjutab lisaks PCDWE sünteesile ka tüve SCC3193 liikuvust. Selleks võrdlesin omavahel SCC3193 tüve ja SCC3193(*fis::Km*) mutandi liikuvust kartuliekstrakti (0,4%) sisaldaval tardsöötmel, mille agari kontsentratsioon oli 0,25%.



Joonis 9. Fis valgu mõju liikuvusele. (a) SCC3193(*fis::Km*), (b) SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*), (c) *Pw* SCC3193, ja (d) SCC3193(pMW119*fis*) liikuvuse testimine tardsöömel (0,25% agar), millele on lisatud 0,4% kartuliekstrakti (0,4%).

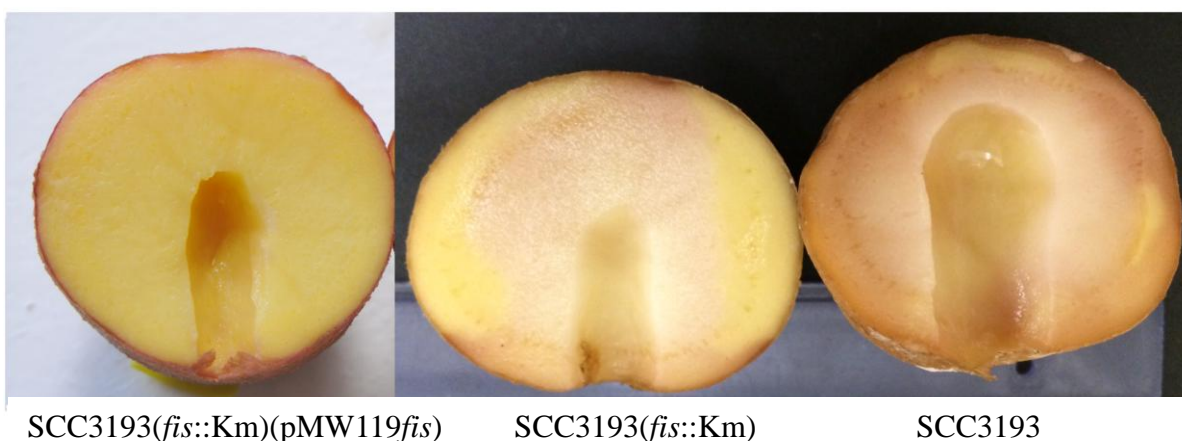
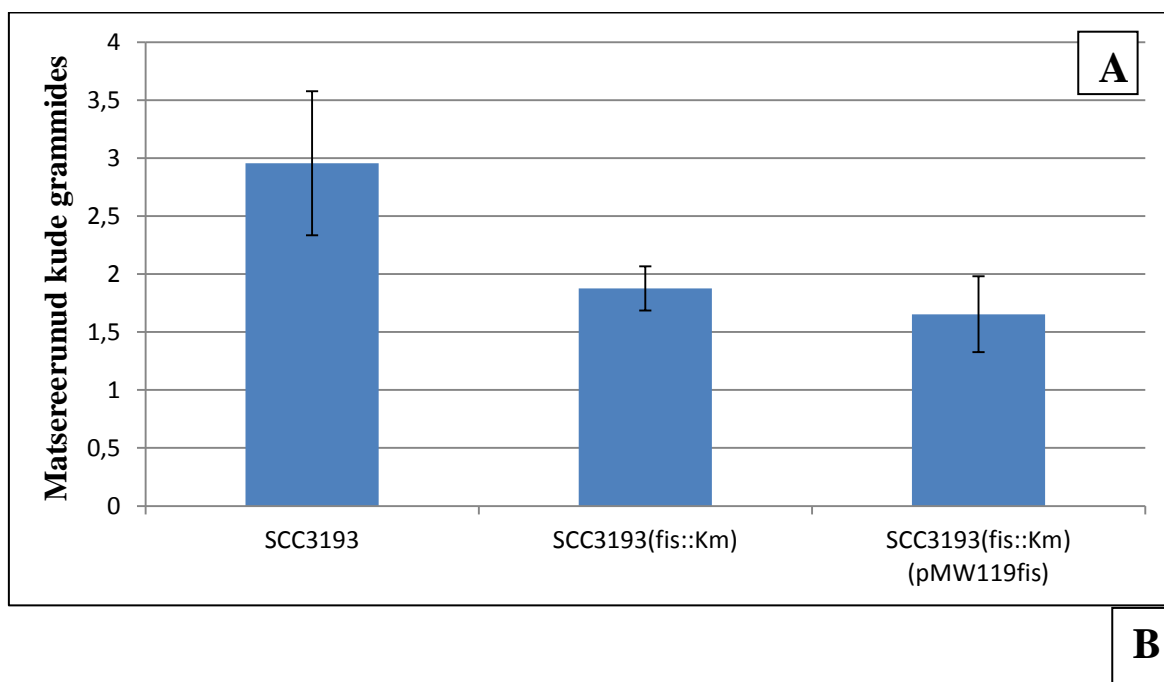
Jooniselt 9 on näha, et SCC3193(*fis::Km*) mutandi liikuvus võrreldes tüvega SCC3193 on oluliselt vähenenud. Fis geeni üleekspressiooni plasmidi (pMW119*fis*) viimisel SCC3193(*fis::Km*) mutanti põhjustas viimase liikuvuse taastumise. Tüvi SCC3193 muutus hüperliikuvaks, kui sellele viis *fis* geeni üleekspressiooni konstrukti (pMW119*fis*). Saadud tulemused näitavad, et Fis valk mõjutab *Pw* tüve SCC3193 liikuvust positiivselt.

Liikuvuse testimiseks tehtud katsetest nähtub, et Fis valk omab *Pw*-le positiivset efekti: *fis* geeni puudumisel on saadud *fis* negatiivne mutant SCC3193(*fis::Km*) liikumatu, Fis-i üleekspressioonil pMW119*fis* plasmidiga on saadud tüvi hüperliikuv (joonis 9). Minu poolt saadud tulemuste põhjal ei ole võimalik täpsemalt öelda, kas Fis mõjutab liikuvust otse reguleerides viburi valkude sünteesiks vajalike geenide ekspressiooni või on mõju kaudne läbi teiste regulatsioonisüsteemide.

Lisaks taime rakuseina lagundavate ensüümide produktsioonile on *Pw* infektsiooni levikuks peremeestaimes oluline ka patogeeni liikuvus (Perombelon, 2002). *Pw*-s on Fis lisaks taime rakuseina lagundavatele ensüümidele ka liikuvuse positiivne regulaator, sest võrreldes tüvega SCC3193 oli *fis* negatiivse mutandi SCC3193(*fis::Km*) liikuvus oluliselt vähenenud (joonis 9). Ka Lautier ja Nasser (2007) poolt konstrueeritud *E. chrysanthemi* *fis* negatiivne mutant pärssis viburigeenide ekspressiooni ning oli seetõttu liikumatu (Lautier ja Nasser, 2007). Seega põhjustab *fis* geeni puudumine nii *Pw* tüves SCC3193 kui ka *E. chrysanthemi* tüves 3937 bakteri liikumatust. SCC3193(*fis::Km*) ja SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*flhDC*) liikuvuste omavahelisel võrdlusel selgus, et SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*flhDC*) on liikuvam kui *fis* negatiivne mutant SCC3193(*fis::Km*) (andmed pole näidatud). Sellest võib järeldada, et Fis reguleerib liikuvust kaudselt läbi FlhDC kompleksi.

2.3.4 Fis mõjutab *Pw* virulentsust kartulis

Pw tüve SCC3193 võime nakatada erinevaid peremeestaimi, määravad ära eelkõige võime sünteesida virulentsusfaktoreid (PCWDE-d) ja liikuda viburite abil primaarsest nakatumiskohast üle kogu taime. Selleks, et selgitada, kas SCC3193(*fis::Km*) mutandi osaliselt vähenenud võime sünteesida PCWDE-sid koos liikumisvõime kadumisega mõjutab ka virulentsust, testisin SCC3193(*fis::Km*) mutandi matseratsioonivõimet ja võrdlesin seda tüvega SCC3193. Selleks nakatasin kartulimugulaid tüvedega SCC3193, SCC3193(*fis::Km*) ja SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*). Katse tulemustest selgus, et SCC3193(*fis::Km*) mutandi virulentsus oli vähenenud võrreldes tüvega SCC3193 (joonis 10A;B) Kartuli nakatamisel SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*) tüvega oli matsereerunud koe hulk võrreldav SCC3193(*fis::Km*) tüvega (joonis 10A).



Joonis 10. *Pw* tüvede SCC3193, SCC3193(*fis::Km*) ja SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*) virulentsus kartulimugulal. (A) Joonisel on näidatud SCC3193, SCC3193(*fis::Km*) ja SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*) tüvedega kartuli nakatamisel saadud keskmine mädanenud koe hulk grammides. Näidatud on standardhälve. (B) Foto SCC3193(*fis::Km*), SCC3193 ja SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*) tüvedega nakatatud kartulitest peale kahjustatud koe eraldamist.

Jooniselt 10A on näha, et SCC3193(*fis::Km*) mutandi, kes produtseerib vähem PCWDE-sid ning on liikumatu poolt põhjustatud kahjustatud (matsereerunud) taimekoe hulk on 2,3 korda väiksem kui SCC3193 poolt kahjustatud taimekoe kogus grammides. Joonis 10B näitab visuaalset erinevust *Pw* tüvede SCC3193, SCC3193(*fis::Km*) ja SCC3193(*fis::Km*)(pMW119*fis*) poolt põhjustatud taimekoe matsereerimisel.

Liikuvuse testimiseks tehtud katsetest selgus, et *fis* geen on liikumise positiivne regulaator ning kuna liikumine on taimepatogeeni seisukohalt oluline, et nakatada üha enam uusi ja terveid taimekudesid, siis kartulite nakatamisel SCC3193 ja SCC3193(*fis*::Km) tüvedega, saadi oodatav tulemus: Fis valku mittekodeeriv SCC3193(*fis*::Km) tüvi matsereeris vähem taimekude kui SCC3193 (joonis 10A, B).

Mitmed uurimisrühmad on näidanud, et peremeestaime edukaks nakatamiseks ja sellele järgnevaks patogeeni efektiivseks paljunemiseks ja levikuks on vajalik taime rakuseina lagundavate ensüümide ja liikuvuse täpne koordineerimine. Erinevatest *Pectobacterium* tüvedest on isoleeritud mitmeid nn. globaalseid regulatooreid, mis koordineerivad virulentsus- ja viburigeenide ekspressiooni (FlhDC, Rcs süsteem) (Chatterjee jt, 2009, 2010; Andresen jt, 2010).

Praeguseks kogunenud tulemuste põhjal võib Fis mõjutada virulentsust, reguleerides nii taime rakuseina lagundavate geenide ekspressiooni kui ka liikuvust. Fis kui globaalne regulaator mõjutab kõikide virulentsusfaktorite (v.a tsellulaas) produktsiooni *P_w* tüves SCC3193, erinedes siinkohal näiteks ExpA regulatsioonisüsteemist, kus kontrollitakse kõikide taime rakuseina lagundavate ensüümide produktsiooni. ExpA geeni inaktiveerimisel saadakse täielikult avirulentne tüvi (Eriksson jt, 1998; Hyytiäinen jt, 2001).

Samas, antud töö tulemustest ei saa kindlalt väita, kas virulentsuse seisukohalt on olulisem PCWDE-de vähenemine või liikuvuse puudumine, kuna katsetest selgus, et taimekudede matsereerimisel ja infektsiooni levikuks on vajalik nii taime rakuseina lagundavate ensüümide kui ka viburigeenide ekspressioon.

2.3.5 Järeldused

Minu poolt saadud tulemused näitavad, et Fis kuulub nn. globaalsete regulaatorvalkude klassi, mis mõjutab kõigi tähtsamate seni teadaolevate virulentsusfaktorite sünteesi. Fis valk on positiivne regulaatorvalk, mille puudumisel on vähenenud kõigi taime rakuseina lagundavate ensüümide (v.a. tsellulaasi) produktsioon. Lisaks on vähenenud ka SCC3193(*fis*::Km) mutandi liikuvus. Sellest tulenevalt võib Fis valku käsitleda kui globaalset regulaatorit, mille ülesandeks on tagada taime rakuseina lagundavate ensüümide ja viburi valkude (liikuvuse) koordineeritud ekspressioon *P_w* peremeestaime nakatamisel.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas ja kuidas mõjutab Fis valk virulentsusfaktorite produktsiooni märgmädanikku põhjustavas fütopatogeenis *Pectobacterium wasabiae*. Selleks konstrueerisin *fis* negatiivse mutandi SCC3193(*fis*::Km). Töö järgmises etapis võrdlesin tüvede SCC3193(*fis*::Km) ja SCC3193 taime rakuseina lagundavate enüümide produktsiooni, liikuvust ja virulentsus kartulimugulatel.

Töö peamised tulemused on:

- konstrueeriti *Pw* tüve SCC3193 *fis* negatiivne mutant
- *fis* geeni mutatsioon ei mõjuta *Pw* kasvu ei indutseerimata (0,2% glükoos) ega indutseeritud (0,2% PGA) tingimustes.
- *fis* on polügalakturonaaside, pektaatlüaaside ja proteaaside positiivne regulaator .
- *fis* negatiivne mutant on liikumatu.
- *fis* negatiivse mutandi võime matsereerida taimekude kartulis on *Pw* tüvega SCC3193 võrreldes vähenenud.

Saadud tulemused on edasiseks aluseks, et uurida täpsemalt, kuidas on reguleeritud *fis* geeni ekspressioon ning kuidas ja millise mehhanismi kaudu mõjutab Fis virulentsusfaktorite sünteesi taimepatogeenis *Pectobacterium wasabiae*.

Construction of *fis* negative mutant and characterization of its role in expression of plant cell wall degrading enzymes and virulence in *Pectobacterium wasabiae*

Liisbeth Kose

SUMMARY

Pectobacterium wasabiae (*Pw*) is a phytopathogenic bacterium, who causes soft rot disease. While *Pw* has a wide host range, including potato, carrot and cabbage, it causes serious economical damage. *Pw* main virulence factors are plant cell wall degrading enzymes (PCWDE), which include pectinases, polygalacturonases, proteases and cellulases. PCWDE production must be well coordinated and regulated in order the disease to spread. There are several systems, that regulate the production of PCWDE. The Rsm system can regulate the production of PCWDE directly by influencing the translation of virulence genes or indirectly through other regulatory genes, which affect their transcription.

While it was previously shown in our lab that the level of Fis was high in RsmA negative mutant, we wanted to test whether Fis could be the regulator of virulence factors.

In order to do that, I constructed a *fis* negative strain SCC3193(*fis*::Km) and compared its enzyme production to SCC3193 strain. Also, other parameters of SCC3193(*fis*::Km) were characterized and compared to SCC3193, such as growth, motility and maceration. This was done to identify the importance of *fis* gene in the virulence of *Pw*.

My experiments showed that the *fis* gene is a positive regulator to PCWDE production, whilst the level of pectinases, polygalaturonases and proteases were lower in SCC3193(*fis*::Km) at all times compared to SCC3193 strain. Furthermore, it was shown that the *fis* gene has no effect on growth neither on glyose (0,2%) nor PGA (0,2%) containing medium. Finally, the virulence of both strains was tested. The constructed *fis* negative strain SCC3193(*fis*::Km), which is immovable, showed lesser ability to macerate the plant tissue tested on potato tubers.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abbott, D.W. and Boraston, A.B.** (2008). "Structural biology of pectin degradation within *Enterobacteriaceae*.", Microbiology and Molecular Biology Reviews (MMBR), 72(2), pp. 301-316.
- Andersson, R. A., Palva, E. T., and Pirhonen, M.** (1999). The response regulator ExpM is essential for the virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and acts negatively on the sigma factor RpoS (σ S). Mol. Plant-Microbe Interact. 12:575-584.
- Andresen, L., Kõiv, V., Alamäe, T., Mäe, A.** (2007). The Rcs phosphorelay modulates the expression of plant cell wall degrading enzymes and virulence in *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. FEMS Microbiol Lett. 273: 229-238.
- Andresen L, Sala E, Kõiv V, Mäe A.** (2010). A role for the Rcs phosphorelay in regulating expression of plant cell wall degrading enzymes in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Microbiology 156: 1323–1334.
- Auner, H., Buckle, M., Deufel, A., Kutateladze, T., Lazarus, L., Mavathur, R., Muskhelishvili, G., Pemberton, I., Schneider, R., and Travers, A.** (2003). Mechanism of transcriptional activation by FIS: role of core promoter structure and DNA topology. *J Mol Biol* 331: 331-344.
- Ball, C. A., R. Osuna, K. C. Ferguson, and R. C. Johnson.** (1992). Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 174: 8043–8056.
- Beach, M. B., and R. Osuna.** (1998). Identification and characterization of the *fis* operon in enteric bacteria. J. Bacteriol. 180: 5932–5946.
- Beaulieu, C., Boccara, M., and Van Gijsegem, F.** (1993). Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 6:197-202.
- Bradley, M.D., Beach, M.B., de Koning, A.P., Pratt, T.S. and Osuna, R.** (2007). Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages. Microbiology. 153: 2922-2940.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, C. K., and Chatterjee, A. K.** (1995). Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulase, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, *N*-(3-oxohexanoyl)-L-Homoserine Lactone. Applied and Environmental Microbiology. 61(5): 1959-1967.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Hasegawa, H., Leigh, N., Dixit, V., Chatterjee, A.K.** (2005). Comparative Analysis of Two Classes of Quorum-Sensing Signaling Systems That Control Production of Extracellular Proteins and Secondary Metabolites in *Erwinia carotovora*

Subspecies. Journal of bacteriology, Vol. 187, No. 23. p. 8026–8038

Chatterjee, A., Cui, Y. Y., Chatterjee, A.K. (2009). RsmC of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls motility, extracellular protein production, and virulence by binding FlhD and modulating transcriptional activity of the master regulator, FlhDC. J Bacteriol 191, 4582–4593.

Chatterjee A, Cui Y, Chakrabarty P, Chatterjee AK. (2010). Regulation of motility in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: quorum-sensing signal controls FlhDC, the global regulator of flagellar and exoprotein genes, by modulating the production of RsmA, an RNA-binding protein. Mol Plant-Microbe Interact 23:1316–1323.

Cho, B.K., Knight, E.M., Barrett, C.L., Palsson, B.O. (2008). Genome-wide analysis of Fis binding in *Escherichia coli* indicates a causative role for A-/AT-tracts. Genome Res 18: 900-910.

Crawford RL. (1981). Lignin biodegradation and transformation. New York, NY: John Wiley and Sons.

Collmer, A., and Keen, N. T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 24:383-409.

Cooper, V.J.; Salmond, G.P. (1993). Molecular analysis of the major cellulase (CelV) of *Erwinia carotovora*: Evidence for an evolutionary "mix-and-match" of enzyme domains. *Mol. Gen. Genet.* 241, 341–350.

Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C. K., and Chatterjee, A. K. (1995). Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft rotting *Erwinia* spp. J. Bacteriol. 177:5108-5115.

Cui, Y., A. Chatterjee, H. Hasegawa, and A. K. Chatterjee. (2006). *Erwinia ncarotovora* subspecies produce duplicate species of ExpR, LuxR homologs that activate *rsmA* transcription but differ in their interactions with *N*-acylhomoserine lactone signals. J. Bacteriol. 188:4715–4726.

Cui, Y., Chatterjee, A., Yang, H., Chatterjee, A. K. (2008). Regulatory network controlling extracellular proteins in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: FlhDC, the master regulator of flagellar genes, activates *rsmB* regulatory RNA production by affecting *gacA* and *hexA* (*lrhA*) expression. J Bacteriol 190, 4610–4623.

Datsenko, K. A., Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA 97, 6640–6645.

Engebrecht J, Silverman M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4154–58

- Engebrecht, J., Silverman, M.** (1987). Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic Acids Res.* 15:10455-10467.
- Eriksson, A. R. B., Andersson, R. A., Pirhonen, M., Palva, E. T.** (1998). Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:743-752.
- Feldman-Cohen LS, Shao Y, Meinhold D, Miller C, Colon W, Osuna R.** (2006). Common and variable contributions of Fis residues to high-affinity binding at different DNA sequences. *J Bacteriol.* 188: 2081–2095.
- Flego, D., Pirhonen, M., Saarilahti, H., Palva, T. K., Palva, E. T.** (1997). Control of virulence gene expression by plant calcium in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Mol. Microbiol.* 25:831-838.
- Flego, D., Marits, R., Eriksson, A.R.B., Koiv, V., Karlsson, M., Heikinheimo, R., Palva, E.T.** (2000). A two-component regulatory system, PehR-PehS, controls endopolygalacturonase production and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 13:447-455.
- Frolova, J.,** (2012) Magistritöö. Plasmiidsete vektorsüsteemide konstrueerimine ja rakendamise Rsm süsteemi mõju uurimiseks taimepatogeenis *Pectobacterium carotovorum* aaml. *Carotovorum*.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harris, S. J., Shih, Y.-L., Bentley, S. D., Salmond, G. P. C.** (1998). The *hexA* gene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants. *Mol. Microbiol.* 28:705-717.
- Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L, Swings J.** (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst Appl Microbiol.* 21(3):384-97
- Heikinheimo, R., Flego, D., Pirhonen, M., Karlsson, M.-B., Eriksson, A., Mäe, A., Kõiv, V., Palva, E. T.** (1995). Characterization of a novel pectate lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:207-217
- Heikinheimo, R., Palva, E. T.** (2000). A two-component regulatory system, pehR-pehS, controls endopolygalacturonase production and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 13, 447–455.
- Heroven, A.K, Böhme, K., Dersch, P.** (2012). The Csr/Rsm system of *Yersinia* and related pathogens. A post-transcriptional strategy for managing virulence. *RNA Biology* 9:4, 379-

- Hoch, J.A., Silhavy, T.J.** (1995). *Two-Component Signal Transduction*. Washington DC: American Society for Microbiology Press.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., Reverchon, R.** (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:213–257.
- Hyytiäinen, H., Montesano, M., Palva, E. T.** (2001). Global regulators ExpA (GacA) and KdgR modulate extracellular enzyme gene expression through the RsmA-rsmB system in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 931–938.
- Hyytiäinen, H., Sjöblom, S., Palomäki, T., Tuikkala, A., Palva, E. T.** (2003). The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Mol Microbiol* 50, 795–807.
- Inoue H., Nojima H., Okayama H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Kelemu, S., Collmer, A.** (1993). *Erwinia chrysanthemi* EC16 produces a second set of plant-inducible pectate lyase isozymes. *Appl Environ Microbiol* 59, 1756-1761.
- Kostrewa, D., J. Granzin, C. Koch, H. W. Choe, S. Raghunathan, W. Wolf, J. Labahn, R. Kahmann, and W. Saenger.** (1991). Three-dimensional structure of the *E. coli* DNA binding protein FIS. *Nature (London)* 348:178–180.
- Kõiv, V., Andresen, L., Broberg, M., Frolova, J., Somervuo, P., Auvinen, P., Pirhonen, M., Tenson, T., Mäe, A.** (2013). Lack of RsmA-Mediated Control Results in Constant Hypervirulence, Cell Elongation, and Hyperflagellation in *Pectobacterium wasabiae*. *PLOS ONE*. 8(1): 1-12.
- Lautier, T., and Nasser, W.** (2007). The DNA nucleoid-associated protein Fis co-ordinates the expression of the main virulence genes in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol*, 66, 66(6), 1474–1490
- Lindeberg, M., Boyd, C.M., Keen, N.T., Collmer, A.** (1998). External loops at the C terminus of *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase C are required for species-specific secretion through the out type II pathway. *J Bacteriol.* 180(6):1431-7.
- Liu, Y., Murata, H., Chatterjee, A., Chatterjee, A.K.** (1993). Characterization of a novel regulatory gene *aepA* that controls extracellular enzyme production in the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:299-308.
- Liu, Y., Cui, Y., Mukherjee, A., Chatterjee, A.K.** (1998). Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Mol. Microbiol.* 29:219-234.
- Liu, Y., Jiang, G., Cui, Y., Mukherjee, A., Ma, W. L., Chatterjee, A.K.** (1999). *kdgREcc*

- negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, harpinEcc, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. J. Bacteriol. 181:2411-2421.
- Loh, J., Pierson, E.A., Pierson III, L.S., Stacey, G., Chatterjee, A. K.** (2002). Quorum sensing in plant associated bacteria. Curr. Opin. Plant Biol. 5:285–290.
- Marits, R., Kõiv, V., Laasik, E., Mäe, A.** (1999). Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. Microbiology 145, 1959–1966.
- Marits, R., Tshuikina, M., Pirhonen, M., Laasik, E., Mäe, A.** (2002). Regulation of the expression of prtW : gusA fusions in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Microbiology 148, 835–842.
- Mattinen, L., Tshuikina, M., Mäe, A., Pirhonen, M.** (2004). Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Mol Plant Microbe Interact 17, 1366–1375.
- McMillan, G.P., Barrett, A.M. and Pérombelon, M.C.M.** (1994). An isoelectric focusing study of the effect of methyl-esterified pectic substances on the production of extracellular pectin isoenzymes by soft rot *Erwinia* spp. J. Appl. Bacteriol. 77, 175–184.
- Mukherjee, A., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, C. K., and Chatterjee, A. K.** (1996). Global regulation in *Erwinia* species by *Erwinia carotovora* rsmA, a homologue of *Escherichia coli* csrA: Repression of secondary metabolites, pathogenicity and hypersensitive reaction. Microbiology 142:427-434.
- Mukherjee, A., Cui, Y., Ma, W., Liu, Y., Ishihama, A., Eisenstark, A., Chatterjee, A. K.** (1998). RpoS (Sigma-S) controls expression of rsmA, a global regulator of secondary metabolites, harpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*. J. Bacteriol. 180:3629-3634.
- Mäe, A., Heikinheimo, R., and Palva, E. T.** (1995). Structure and regulation of the *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* SCC3193 cellulase gene celVI and the role of cellulase in phytopathogenicity. Mol. Gen. Genet. 247: 17–26.
- Nasser, W., Bouillant, M.L., Salmond, G., Reverchon, S.** (1998) Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* expI–expR locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules. Mol. Microbiol. 29, 1391–1405.
- Nealson, K.H., Hastings, J.W.** (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiol. Rev. 43:496–518
- Ninnemann, O., Koch, C., Kahmann, R.** (1992). The *E.coli* fis promoter is subject to stringent control and autoregulation. Embo J 11: 1075-1083.
- Nykyri, J., Niemi, O., Koskinen, P., Nokso-Koivisto, J., Pasanen, M., Broberg, M.,**

- Plyusnin, I., Totonen, P., Holm, L., Pirhonen, M., Palva, Tapio E.** (2012). Revised Phylogeny and Novel Horizontally Acquired Virulence Determinants of the Model Soft Rot Phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. *PLOS Pathogens*. 8(11): 1-18.
- Osuna, R., Finkel, S.E., Johnson, R.C.** (1991). Identification of two functional regions in Fis: the N-terminus is required to promote Hin-mediated DNA inversion but not lambda excision. *EMBO J.* 10:1593–1603.
- Ottmann C, Luberaeki B, Kufner I, Koch W, Brunner F, Weyand M,** (2009). A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA*; 106:10359–10364.
- Pemberton, C.L., Whitehead, N.A., Sebaihia, M., Bell, K. S., Hyman, L J., Harris, S. J., Matlin, A. J., Robson, N. D., Birch, P. R. & other authors** (2005). Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: identification of a fungal elicitorhomologue in a soft-rotting bacterium. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 343–353.
- Pérombelon, M. C. M.** (2002). Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol* 51, 1–12.
- Pérombelon, M.C.M, Salmond, G.P.C** (1995). Bacterial soft rots. In: Singh U.S., Singh R.P., Kohmoto K. (eds). *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Disease*. 1: 1- 20.
- Pirhonen, M., Heino, P., Helander, I., Harju, P., Palva, E. T.** (1988). Bacteriophage T4 resistant mutants of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microb. Pathog.* 4:359-367.
- Pirhonen, M., Saarilahti, H., Karlsson, M.-B., Palva, E.T.** (1991). Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposon mutagenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4, 276-283.
- Reimann, C., Valverde, C., Kay, E., Haas, D.** (2005). Posttranscriptional Repression of GacS/GacA-Controlled Genes by the RNA-Binding Protein RsmE Acting Together with RsmA in the Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of bacteriology*. 187: 276–285.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M.Y., Brun-Zinkernagel, A.M.** (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J. Bacteriol.* 175:4744–4755.
- Romeo, T.** (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* 29:1321–1330.
- Saarilahti, H. T., Heino, P., Pakkanen, R., Kalkkinen, N., Palva, I., Palva, E. T.** (1990). Structural analysis of the *pehA* gene and characterization of its protein product, endopolygalacturonase, of *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*. *Mol. Microbiol.*

4:1037-1044.

- Saarilahti, H. T., Pirhonen, M., Karlsson, M.-B., Flego, D., Palva, E.T.** (1992). Expression of *pehA-bla* gene fusions in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and isolation of regulatory mutants affecting polygalacturonase production. *Mol. Gen. Genet.* 234:81–88.
- Safo, M.K., Yang, W.Z., Corselli, L., Cramton, S.E., Yuan, H.S. and Johnson, R.C.** (1997). The transactivation region of the *fis* protein that controls site-specific DNA inversion contains extended mobile beta-hairpin arms. *EMBO J.* 16: 6860-73.
- Sambrook, J., Russell, D. W.** (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicten, S., Coulson, A.R.** (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463- 5467.
- Shao, Y., Feldman-Cohen, L.S. and Osuna, R.** (2008). Functional characterization of the *Escherichia coli* Fis-DNA binding sequence. *J Mol Biol.* 376: 771-785.
- Sjöblom, S., Brader, G., Koch, G., Palva, T. E.** (2006). Cooperation of two distinct *ExpR* regulators controls quorum sensing specificity and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol Microbiol* 60, 1474–1489.
- Skoko, D., Yoo, D., Bai, H., Schnurr, B., Yan, J., McLeod, S.M., Marko, J.F., Johnson, R.F.** (2006). Mechanism of chromosome compaction and looping by the *Escherichia coli* nucleoid protein Fis. *J Mol Biol* 364: 777-798.
- Stella, S., Cascio, D., Johnson, R.C.** (2010). The shape of the DNA minor groove directs binding by the DNA-bending protein Fis. *Genes Dev.* 24: 814-26.
- Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C. and Birch, P. R. J.** (2003). Soft-rot erwiniae: from genesto genomes. *Molecular Plant Pathology.* 4(1): 17-30.
- Vidal, S., Ponce de Leo, I., Denecke, J. & Palva, E. T.** (1997). Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defence genes via antagonistic pathways. *Plant J* 11, 115-123.
- Walker, D., Reeves, P. J., and Salmond, G. P. C.** (1994). The major secreted cellulase, CelV, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is an important virulence factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:425-431.
- Wei, B., Brun-Zinkernagel, A.M., Simecka, J.W., Pruss, B. M., Babitzke, P., Romeo, T.** (2001). Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 40:245–256.
- West, A.H., Stock, A.M.** (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26:369-376

LIHTLITSENTS

Mina, Liisbeth Kose (30.03.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

***Pectobacterium wasabiae* tüve SCC3193 *fis* negatiivse mutandi konstrueerimine ja iseloomustamine**

mille juhendaja on Andres Mäe

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014